

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-512260

(P2002-512260A)

(43) 公表日 平成14年4月23日 (2002. 4. 23)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード* (参考)

C 0 7 K 1/06

C 0 7 K 1/06

A 6 1 K 9/00

A 6 1 K 9/00

B 2 9 C 67/00

B 2 9 C 67/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 63 頁)

(21) 出願番号 特願2000-545070(P2000-545070)
 (86) (22) 出願日 平成11年4月21日 (1999. 4. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年10月23日 (2000. 10. 23)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S . 9 9 / 0 8 8 0 5
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 5 4 7 8 4
 (87) 国際公開日 平成11年10月28日 (1999. 10. 28)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 8 2 , 5 7 5
 (32) 優先日 平成10年4月21日 (1998. 4. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 1 1 2 , 7 9 7
 (32) 優先日 平成10年12月18日 (1998. 12. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ユニバーシティ オブ コネチカット
 アメリカ合衆国 コネチカット州 ファー
 ミントン エム シー 5355 ファーミン
 トン アベニュー 263
 (72) 発明者 グッドマン スティーブン エル
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マデ
 ィソン テリー プレース 858
 (72) 発明者 カンバグノーラ ポール
 アメリカ合衆国 コネチカット州 シムス
 ベリー ウィーラー ロード 34
 (74) 代理人 弁理士 吉田 研二 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多光子励起を用いたフリーフォームナノ製作

(57) 【要約】

前駆体組成物の多光子吸収光重合および/または架橋、すなわち、多光子励起を用いた光重合により、小規模の2次元または3次元構造が形成される方法及び装置。多光子励起を使用することにより、少なくとも1つの寸法が約1 μ 未満であり、好ましくは約500 nm未満であり、さらに好ましくは約250 nm未満であり、最も好ましくは約100 nm未満である構造及び構造特徴を、バルク相、及び溶液中で、蛋白質類、脂質類、オリゴヌクレオチド類などの合成ポリマー及び生物ポリマーを含む様々な有機および無機前駆体サブユニットから、製作することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 光活性化可能な前駆体組成物を提供する工程と、

前記前駆体組成物の少なくとも1つの第1の位置における多光子励起を用いて前記前駆体組成物を活性化し、小規模構造の少なくとも1つの第1の部分形成する工程であって、該少なくとも1つの第1の部分のX-Y方向の寸法は約300ナノメートル未満である工程と、
を含む小規模構造の製作方法。

【請求項2】 前記少なくとも1つの第1の部分のZ方向の寸法は、約500ナノメートル未満である請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記少なくとも1つの第1の部分のX-Y方向の寸法は、約250ナノメートル未満である請求項1記載の方法。

【請求項4】 前記少なくとも1つの第1の部分のZ方向の寸法は、約300ナノメートル未満である請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記少なくとも1つの第1の部分のZ方向の寸法は、約100ナノメートル未満である請求項3記載の方法。

【請求項6】 前記少なくとも1つの第1の部分のX、Y、Z方向の寸法は、約50ナノメートル未満である請求項1記載の方法。

【請求項7】 光活性化可能な前駆体組成物を提供する工程と、

前記前駆体組成物の少なくとも1つの第1の位置における多光子励起を用いて前記前駆体組成物を活性化し、小規模構造の少なくとも1つの第1の部分形成する工程と、
を含み、

前記第1の部分の点体積の寸法は約1 μ m未満である小規模構造の製作方法。

【請求項8】 前記第1の部分の点体積の少なくとも1つの寸法は約500nm未満である請求項6記載の方法。

【請求項9】 前記第1の部分の点体積の少なくとも1つの寸法は約250nm未満である請求項6記載の方法。

【請求項10】 前記第1の部分の点体積の少なくとも1つの寸法は約100nm未満である請求項6記載の方法。

【請求項 1 1】 前記第 1 の部分の点体積の少なくとも 1 つの寸法は約 50 nm 未満である請求項 6 記載の方法。

【請求項 1 2】 前記光活性化可能な前駆体組成物は、光重合可能な有機モノマー類、光重合可能な無機モノマー類、架橋剤類、少なくとも 1 つのオレフィン結合を有するモノマー類、少なくとも 1 つのオレフィン結合を有するオリゴマー類、少なくとも 1 つのオレフィン結合を有するポリマー類、オレフィン類、ハロゲン化オレフィン類、アクリレート類、メタクリレート類、アクリルアミド類、ビスアクリルアミド類、スチレン類、エポキシド類、シクロヘキセンオキシド類、アミノ酸類、ペプチド類、蛋白質類、脂肪酸類、脂質類、ヌクレオチド類、オリゴヌクレオチド類、合成ヌクレオチド類似体類、核酸類、糖類、炭水化物類、サイトカイン類、ホルモン類、レセプター類、成長因子類、薬物類、及びこれらの混合物からなる群から選択される光活性化可能な前駆体を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 3】 前記光活性化可能な前駆体組成物は、蛋白質類、フィブリノーゲン、ウシ血清アルブミン、トリメチロールプロパントリアクリレート、及びポリウレタン前駆体からなる群から選択される光活性化可能な前駆体を含む請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】 前記前駆体は蛋白質である請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 5】 前記前駆体組成物は、さらに光開始剤を含む請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 6】 前記光開始剤は、アゾ化合物、アゾビスイソブチロニトリル、過氧化物類、過酸化ベンゾイル、ケトン及びジケトンなどの脂肪族、芳香族ジケトン類、ベンゾフェノン、9-フルオレノン-2-カルボン酸、 $\text{Fe}^{3+}\text{OH}^-$ 、 $\text{Pb}^{2+}\text{Cl}^-$ 、感光性染料、エオシン、ローズベンガル、エリトロシン、感光性遷移金属誘導体、有機ハロゲン化物の存在下における $\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}$ 、複雑な金属ハロゲン化アニオンを有するトリアリールスルホニウム塩類、複雑な金属ハロゲン化物アニオンを有するジアリールヨードニウム塩、複雑な金属ハロゲン化物アニオンの混合アレーンシクロペンタジエニル金属塩、及び(6-ベンゼン)(5-シクロペンタジエニル) $\text{Fe}(\text{II})$ ヘキサフルオロホスフェートから

なる群から選択される請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 7】 活性化は、バルク中、溶液中、基板に吸着されて、懸濁液中、あるいはエマルジョン中である請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 8】 活性化は、2 光子、3 光子、あるいは 4 光子励起による請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 9】 活性化により、前記前駆体組成物の重合または架橋が起こる請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 0】 可動ステージ上に配置された第 1 の高 NA レンズと、前記可動ステージの真下に配置された第 2 の高 NA レンズとを備える 4 p i 光学機械に接続された光子源を含む、多光子励起による製作のための装置。

【請求項 2 1】 さらに、前記光子源と第 1 の高 NA レンズとの間に配置された第 2 の可動ステージを備える請求項 2 0 記載の装置。

【請求項 2 2】 製作用の近視野光ファイバ要素と結合された光ファイバカップラーを備える近視野光学機械と接続された光子源を含む、多光子励起による製作のための装置。

【請求項 2 3】 さらに、イメージング要素として光学顕微鏡を備える請求項 2 2 記載の装置。

【請求項 2 4】 光学要素は、多バレルピペットと結合される請求項 2 2 記載の装置。

【請求項 2 5】 光学要素はピペットバレルの 1 つ内に配置される請求項 2 4 記載の装置。

【請求項 2 6】 前記第 1 の部分は、第 1 の前駆体組成物から製作され、第 2 の部分は第 2 の前駆体組成物から製作される請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 7】 前記第 1 の部分は、第 1 の波長で製作され、第 2 の部分は第 2 の波長で製作される請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 8】 少なくとも 1 つの構成前駆体と少なくとも 1 つの作用物質を含む光活性化可能な前駆体組成物を提供する工程と、

前記前駆体組成物中の少なくとも 1 つの第 1 の位置において多光子励起を用いて前記前駆体組成物を活性化させ、構成の少なくとも 1 つの第 1 の部分を形成す

る工程であって、前記少なくとも1つの第1の部分のX-Y方向の寸法は約300ナノメートル未満であり、前記作用物質は前記構成内にトラップされる工程と

を含む、作用物質を構成体内にトラップさせる方法。

【請求項29】 前記作用物質は、成長因子類、ヌクレオチド類、イオン類、緩衝薬類、染料類、蛋白質類、ペプチド類、酵素類、炭水化物類、グリコサミノグリカン類、リポソーム類、細胞類、薬物類、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される請求項28記載の方法。

【請求項30】 前記構成は、制御された放出特性、制御された分解特性、制御された拡散特性、あるいはそれらの組み合わせを有する請求項28記載の方法。

【請求項31】 拡散または放出特性は、作用物質の構成に対する親和性、構成の架橋密度の程度、構成の分解速度、構成の組成、あるいはそれらの組み合わせを制御することにより制御される請求項30記載の方法。

【請求項32】 前記作用物質の前記構成に対する親和性の程度の制御は、バックボーン及び／または架橋組成物の適当な選択によるものである請求項31記載の方法。

【請求項33】 架橋または重合密度の制御は、照射時間、強度（光子エネルギー密度）、構成の空間寸法、試薬のトラップされていないオーバー層の追加を変化させることによるものである請求項31記載の方法。

【請求項34】 光活性化可能な前駆体組成物を提供する工程と、
前記前駆体組成物の少なくとも1つの第1の位置における多光子励起を用いて前記前駆体組成物を活性化し、構成の少なくとも1つの第1の部分的形成する工程であって、該少なくとも1つの第1の部分のX-Y方向の寸法は約300ナノメートル未満である工程と、

構成の残りを形成する工程と、

形成された構成内に作用物質をトラップさせる工程と、

を含む構成内に作用物質をトラップさせる方法。

【請求項35】 前記作用物質は、成長因子類、ヌクレオチド類、イオン類

緩衝薬類、染料類、蛋白質類、ペプチド類、酵素類、炭水化物類、グリコサミノグリカン類、リポソーム類、細胞類、薬物類からなる群から選択される請求項34記載の方法。

【請求項36】 前記作用物質は、ゲルまたは構成内に拡散する分子上で、その分子がゲルまたは構成から拡散して出て行くまで連続的に作用するトラップされた酵素；ゲルまたは構成内に拡散する分子上で作用し、この作用によりゲルまたは構成から出て行くことができなくなる酵素類、キレート化剤類、あるいは他の分子類；ゲル内に特定の分子類、イオン類、または他の作用物質が拡散して入ってくると、製作された構成が、揺れ動き、形状が変化し、その拡散特性が変化するようにさせる運動性蛋白質類、ペプチド類、または非生物構造類；一定の波長、偏光、あるいは他の光の状態で照射されると、色、屈折、拡散、輸送、形状、又は他の物理的特性あるいは生物化学活性が変化する光力学的分子類；イオン類、pH、及び生物分子などのゲルまたは他の構成内に拡散する化学作用物質の活性により、色、屈折、拡散、輸送、又は他の物理的及び／または生物化学活性が変化するトラップされた化学活性分子類；ナノオクタローニー様免疫拡散測定法のための蛋白質；生細胞；あるいはこれらの組み合わせからなる群から選択される請求項34記載の方法。

【請求項37】 前記蛋白質類または細胞類は、エンキャプシュレーション、構成との共有結合による架橋、あるいはこれらの組み合わせによりトラップされる請求項36記載の方法。

【請求項38】 光活性化可能な前駆体組成物と表面を提供する工程と、前記前駆体組成物の少なくとも1つの第1の位置における多光子励起を用いて前記前駆体組成物を活性化し、構成の少なくとも1つの第1の部分形成する工程であって、該少なくとも1つの第1の部分のX-Y方向の寸法は約300ナノメートル未満であり、前記少なくとも1つの第1の部分は前記表面に共有結合により結合されている工程と、

を含む材料の表面を修飾するための方法。

【請求項39】 前記表面は集積チップの表面である請求項38記載の方法。

【請求項40】 前記表面は多光子励起により架橋されたウシ血清アルブミンを含み、前記構成光活性前駆体はフィブリノーゲンを含む請求項39記載の方法。

【請求項41】 前記修飾された表面は組織細胞培養のための足場を提供する請求項39記載の方法。

【請求項42】 前記表面は少なくとも1つの運動性蛋白質への付着により修飾される請求項39記載の方法。

【請求項43】 前記運動性蛋白質は、キネシン、微小管、アクチン、アクソネマ、鞭毛、あるいはこれらの組み合わせからなる群から選択される請求項42記載の方法。

【請求項44】 光活性化可能な前駆体組成物とチップ表面を提供する工程と、

前記前駆体組成物の少なくとも1つの第1の位置における多光子励起を用いて前記前駆体組成物を活性化し、センサの少なくとも1つの第1の部分を形成する工程であって、該少なくとも1つの第1の部分のX-Y方向の寸法は約300ナノメートル未満であり、前記少なくとも1つの第1の部分は前記チップ表面に共有結合により結合される工程と、

を含むセンサアレイチップの表面を製造するための方法。

【請求項45】 光活性化可能な前駆体組成物と第1の作用物質を提供する工程と、

前記前駆体組成物の少なくとも1つの第1の位置における多光子励起を用いて前記前駆体組成物を活性化し、構成の少なくとも1つの第1の部分を形成する工程であって、該少なくとも1つの第1の部分のX-Y方向の寸法は約300ナノメートル未満であり、前記少なくとも1つの第1の部分は前記作用物質に共有結合により結合される工程と、

第2の作用物質と共に活性化を繰り返し、第2の作用物質が第1の試薬に対し空間的に配列されるようにする工程と、

を含む作用物質の空間的な配向を提供する方法。

【請求項46】 前記第1の作用物質と第2の作用物質は、酵素類、抗体類

、レセプター類、リボソーム類及びそれらの組み合わせからなる群から選択される請求項45の方法。

【請求項47】 前記第1及び第2の作用物質は生物化学合成を実行する、あるいは分離を実行する請求項46記載の方法。

【請求項48】 前記第2の作用物質は、自己組織化、静電場、磁場、せん断力の適用、レーザピンセット、磁気ピンセット、及びそれらの組み合わせにより配列される請求項46記載の方法。

【請求項49】 光活性化可能な前駆体組成物と外植された組織を提供する工程と、

前記前駆体組成物の少なくとも1つの第1の位置における多光子励起を用いて前記前駆体組成物を活性化し、構成の少なくとも1つの第1の部分を形成する工程であって、該少なくとも1つの第1の部分のX-Y方向の寸法は約300ナノメートル未満であり、前記少なくとも1つの第1の部分は前記外植された組織に共有結合により結合される工程と、

を含む外植された組織を修飾する方法。

【請求項50】 前記構成は、前記組織を架橋させ、キレート化剤または抗菌剤を組織に結合させ、あるいはそれらの組み合わせを行う請求項49記載の方法。

【請求項51】 光活性化可能な前駆体組成物を提供する工程と、

前記前駆体組成物の少なくとも1つの第1の位置における多光子励起を用いて前記前駆体組成物を活性化し、型の少なくとも1つの第1の部分を形成する工程であって、該少なくとも1つの第1の部分のX-Y方向の寸法は約300ナノメートル未満である工程と、

を含む多重製造の型を製造する方法。

【請求項52】 前記型は、鋳型、スタンパー、マスクまたはフォトリソグラフィ用マスクである請求項51記載の方法。

【請求項53】 製作により動的形状変化を受ける光活性化可能な前駆体組成物を提供する工程と、

前記前駆体組成物の少なくとも1つの第1の位置における多光子励起を用いて

前記前駆体組成物を活性化し、型の少なくとも1つの第1の部分形成する工程であって、該少なくとも1つの第1の部分のX-Y方向の寸法は約300ナノメートル未満である工程と、

を含む複雑な三次元型を製造するための方法。

【請求項54】 環境の変化に暴露されると動的形状変化を受ける光活性化可能な前駆体組成物を提供する工程と、

前記前駆体組成物の少なくとも1つの第1の位置における多光子励起を用いて前記前駆体組成物を活性化し、型の少なくとも1つの第1の部分形成する工程であって、該少なくとも1つの第1の部分のX-Y方向の寸法は約300ナノメートル未満である工程と、

を含む複雑な三次元型を製造するための方法

【請求項55】 前記環境の変化は、温度、溶剤、イオン強度、配位子の存在あるいはこれらの組み合わせにおける変化である請求項54記載の方法。

【請求項56】 光ファイバカップラーと群速遅延自己位相変調補償器を介して単一モードの光ファイバの第1の端に接続された光子源であって、光ファイバの第2の端が多光子製作作用のレンズを備える光子源を備える、遠隔地点での多光子励起による製作のための装置。

【請求項57】 前記光ファイバはカテーテル内に收容されている請求項56記載の装置。

【請求項58】 前記カテーテルはさらに、製作部位において試薬を投与するための少なくとも1つの試薬管内に收容されている請求項57記載の装置。

【請求項59】 前記光ファイバの第2の端はさらにカウリングを備える請求項56記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は一般に、ナノスケールの構造を形成する方法及びこの方法により形成されたナノスケールの構造に関する。特に、この発明はナノメートルレベルの精度の構造を製作するための、多光子励起を用いた方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

微小規模の微細構造を有する三次元物体は、特有のかつ技術的に魅力的な特性を備える。最近、ナノメートルレベルの精度を備えた構造、すなわち、ナノメートルレンジで測定可能な構造あるいは構造特徴を有する物体の製造に対し、特に関心が高まっている。そのようなナノスケールの構造は、約2から約100nm（ナノメートル、1nm=10オングストローム）の範囲の寸法あるいは特徴を有し、その範囲は、大体、蛋白質及び蛋白質錯体などの巨大分子のサイズである。

【0003】

小スケールの特徴を有する2次元構造を製造するには、X線及び遠紫外線を使用する方法を含むフォトリソグラフィが周知である。しかしながら、この技術では、z-方向で達成可能な複雑性が非常に限られているので、複雑な、湾曲した3次元表面を作製することができない。そのため、フォトリソグラフィにより作製される3次元物体は、本質的には、円柱構造に限定されてきた。150nmより小さい特徴を有する物体は、容易に作製することができない、あるいはごく普通に得ることができない。ジョージ M. ホワイトサイデス (Whitesides) はまた、マイクロコンタクト印刷及び自己集合単一層を用いた表面化学の改良を基本とするマイクロスケールの作製方法のいくつかについて説明している。しかしながら、これらの方法は、第3次元、及びその化学において構築するのに非常に限定される。2光子励起を用いたポリエステルの反応による三次元光データ記憶及び検索構造を製造するための方法が、ストリクラー (Strickler) らに付与された米国特許第5, 289, 407号において開示されている。この内容は全

て、この中で引用され参照される。

【0004】

小規模特徴、例えば基底膜組織などのバイオミメティックマトリクストポグラフィーを有する3次元物体の合成について、多くの他の、異なるアプローチが説明されている。米国特許第5,700,241において説明されているように、そのような構造は、上皮または内皮細胞層を除去し、支持基底膜またはマトリクスを暴露させることにより製造される。その後、暴露されたトポグラフィーは、ポリマー鑄造のための鑄型として使用される。得られたマトリクストポグラフィーの鑄造された負のレプリカの表面は、それ自体、選択された最終的な（生物）材料と共に鑄造される。この方法を用いると、三次元バイオミメティックマトリクスが、細胞生物学の実験研究のために、及び移植された生物材料に対する細胞及び組織応答を改善する可能性のために、調製されることが可能である。この方法では非常に複雑な三次元トポグラフィーが作成されるが、トポグラフィーの設計融通性が提供されない。というのは、すべての構成が、生物表面から開始しなければならないからである。さらに、多くの材料を製作に使用してもよいが、この手順では、化学の空間的制御が提供されない。

【0005】

走査型トンネル顕微鏡もまた、表面上の原子を移動させるために、使用されていた。しかしながら、この技術は、製作される領域のサイズ及び化学において著しく限定される。マイクロスケールの構造の固体フリーフォーム製作について説明されている他の技術としては、流動媒質または他の床の表面での物体の連続する、隣接、断面薄層の形成が挙げられ、この連続薄層は、ハルに付与された米国特許第4,575,330において開示されているように、形成されるにつれ、自動的に統合され、所望の3次元物体を規定する。シーマ（Cima）らに付与された米国特許第5,518,680号においてもまた、溶剤中の粉末の層の連続印刷が開示されており、これにより、連続層が結合され、約100 μ mのオーダーの厚さを有する薬物供給装置の形成が可能となる。

【0006】

3次元物体はまた、3次元体積の流体媒質内の所定の交差点に選択的に焦点が

合わせられた紫外線 (UV) 照射ビームにより反応性流動媒質を選択的に硬化させることにより生成されている。このような合成の欠点には、UV照射を使用することが含まれ、UV照射では、高価で厄介な光学機械やレンズ、及び関連する焦点合わせ品質の悪いエキシマーや他のUVレーザ源が必要である。

【0007】

3次元マイクロスケール物体を生成させる他の技術は、S. マルオ、O. ナカムラ、S. カワタらの「2光子吸収光重合を用いた3次元微小製作」と題する、光学レター、Vol. 22、No. 2、pp. 132-134 (1997) において説明されている。この内容は、全体として、この中で引用され参照される。マルオらは、マイクロスケール構造は、ウレタンアクリレートモノマー及びオリゴマーを、非溶剤系において、近赤外レーザ光にさらすことにより形成されることを開示している。反応を開始させるのに2光子吸収を使用すると、直径6 μm 、軸方向ピッチ10.3 μm 、幅約1.3 μm のらせんワイヤが得られる。小さいが、そのような構造はナノスケール範囲にはない。マルオらは、さらに、ほとんどの生物分子と不適合な非溶剤系における合成について説明しているだけである。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

したがって、マイクロメートル及びナノメートル範囲の寸法または特徴を有する2次元または3次元構造のフリーフォーム製作方法、とりわけ蛋白質、ペプチド、オリゴヌクレオチドなどの生物分子サブユニット、及びホルモン、サイトカイン、薬物などの生物活性小分子を用いた合成に適する技術に対する必要性がまだある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

従来の技術の上記欠点及び他の欠点、及び欠陥は、本発明の方法及び装置により克服される、あるいはある程度軽減される。この発明では、小さな2次元または3次元構造が、前駆体組成物の多光子吸収光重合及び／または架橋、すなわち、多光子励起を用いた光重合により形成される。多光子励起の使用により、バル

ク相において及び溶液中で、蛋白質、脂質、オリゴヌクレオチドなどの合成ポリマー及び生物ポリマーを含む、広範囲にわたる有機及び無機前駆体サブユニットから、少なくとも1つの寸法が約1 μ m未満、好ましくは約500nm未満、より好ましくは約250nm未満、最も好ましくは約100nm未満である構造及び構造特徴の製作が可能となる。

【0010】

1つの実施の形態では、2光子遠視野光学機械を用いると、X-Y次元が約300nm未満、Z次元が約500nm未満の構造を形成することができ、一方、3光子遠視野光学機械を用いると、X-Y次元が約250nm未満、Z次元が約300nm未満の構造を形成することができる。特に好ましい実施の形態では、2光子遠視野励起と共に4pi光学構成を用いると、X-Y次元が約150nm未満、Z次元が約100nm未満の構造を形成することができる。他の実施の形態では、多光子近視野光学機械を使用すると、X、Y、Z次元が約50nm未満の構造が得られる。この実施の形態では、ファイバプローブによる2光子励起により、近視野製作が達成される。関連する実施の形態では、近視野の実施の形態の光学素子が多バレルピペットと結合され、複数の領域に同時にあるいは連続して成分が正確に配送されるようにされる。

【0011】

この中で説明されている方法は、様々な小規模構造を形成するのに有効である。1つの実施の形態では、非架橋作用物質が、多光子励起により形成されたゲルまたはマトリクス内に（永久的にまたは一時的に）トラップされる。そのようなゲルまたはマトリクスは制御された、放出、分解、及び／または拡散係数特性を有する。作用物質には、蛋白質、ペプチド、炭水化物、薬物、酵素、リポソーム、ヌクレオチド、及び細胞が含まれる。関連する実施の形態では、様々な架橋密度及び／または化学的性質を有する装置を製作するのに多光子励起が使用され、薬物供給、生物材料、組織工学、及び環境適用における制御された放出装置として使用するための様々な分解特性を有する材料が生成される。

【0012】

他の実施の形態では、多光子励起が使用され、生物材料あるいは従来通りに製

作された材料が改良される。材料は複雑な表面特徴を有してもよく、あるいはこの方法を使用して、材料に複雑な特徴を付与してもよい。例示的な適用としては、集積回路（IC）チップに1つ以上の生物活性機能を追加すること、組織細胞培養物と共に使用するためのバイオミメティック表面を製造すること、外植した組織を再移植または他の用途のために修飾することが含まれる。顕微鏡と多光子励起を組合せると、1つの表面上に1つ以上の特徴のマイクロ配置が可能となる。関連する実施の形態では、多光子励起が使用されて、繊毛のある表面または運動性蛋白質を使用する他のマイクロサイズの輸送装置が製造される。

【0013】

他の実施の形態では、多光子励起が使用されて、収縮または拡張効果と共に、動的形状変化効果（すなわち、ポアソン比効果）、及び／または所定の化学条件下で活性な官能基により、より複雑な構造となる構造が作製される。そのような構造は、可変フィルタとして、または物理的力を働かせ、流体流を変化させるなどのスモールスケールアクチュエータとして、使用されてもよい。関連する実施の形態では、光学装置は、光学的に活性でキラルな化合物を配列させることにより、層状に、及び／または他の2次元または3次元構成で製造される。

【0014】

他の実施の形態では、多光子励起が使用され、基質上または基質内での酵素の空間的な配向または製造構築物が提供される。組織化は、静電場、選択的吸着、せん断力の適用により、及び光学的及び磁氣的のトラップにより、提供される。

【0015】

他の実施の形態では、蛋白質は、光増感剤及び化学架橋剤を使用せずに、直接架橋される。

【0016】

他の実施の形態では、多光子励起が使用され、光ファイバを介して遠隔部位でのナノ製作が達成される。そのような光ファイバは、例えば、カテーテルの内部に配置してもよい。この実施の形態におけるナノ製作は、薬物または他の生物学的に活性な作用物質の供給、組織工学足場（scaffolding）薬、成長因子などの制御された供給、及びステントなどの構造要素または装置の最小侵襲性組立てを

含む。

【0017】

この発明の方法及び装置により、以前に可能であったものより小さな寸法の構造の形成が可能となる。この発明の上述の特徴及び他の特徴、及び利点は、以下の詳細な説明及び図面により、当業者に理解されるであろう。

【0018】

図において、同様の要素には同様の符号が付してある。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明によれば、前駆体組成物の多光子誘起重合または架橋により小さな2次元または3次元構造が形成される。便宜上、この中で使用されるように「構造」及び「構成」は、全体としてマイクロスケール及びナノスケールの物体の両方、すなわち、全部のX-YまたはX-Y-Z寸法が μm 及び nm 範囲内にある物体、及びX-YまたはX-Y-Z寸法が μm 及び mm 範囲内にある特徴を有するより大きな物体を示す。この中で使用されているように、「多光子励起」は、反応分子による多数の光子の同時吸収を意味する。この方法は特に、 μm 及び nm スケールの寸法を有する3次元物体または構造、すなわち約 $1\mu\text{m}$ 未満の寸法を有する点体積の要素、好ましくは少なくとも1つの寸法が約 500nm 、 250nm 、 100nm 未満である要素、最も好ましくは約 50nm 未満の要素から構築された構造の形成に適している。構造形状は、最終構造の所望の形態により規定されるように、前駆物質の光励起及び反応のために使用される光学的方法、レーザ及び/またはステージの移動、前駆物質の選択に依存するであろう。以下の説明はレーザ励起に関するものであるが、十分な光子密度を達成するための他の方法もまた本発明の範囲内にあることは理解されるであろう。

【0020】

図1において概略が示されているように、光子源、例えばパルス近赤外レーザー12は、光学機械13を介して、放射線誘起光重合または架橋が可能な前駆体組成物14内に焦点が合わせられる。特に好都合な特徴では、前駆体組成物14は水溶液である。前駆体組成物14は、ステージ16上に配置され、このステー

ジはX、Y及び／またはZ方向に移動することができる。焦点が合わされた波長は、線形光学機械で反応種の光活性化を行うのに必要なものの大体偶数の倍数であり、多光子励起が得られる。しばしば、単一光子吸収により通常到達される現実の励起状態はまた、2量子の吸収により励起されてもよい。この場合、それぞれが単一光子のエネルギーの半分を有する。あるいは3量子の吸収により励起されてもよい。この場合、それぞれが単一光子のエネルギーの3分の1を有する。多光子励起状態は、しばしば、単一光子励起状態のために必要とされる波長の正確な偶数倍数ではない。重要なことは、光子が同時に分子上に衝突しなければならないことであり、そのため、励起速度は、入射強度の2乗に比例する。そのため、励起は、強度が非常に高い楕円焦点体積に制限される。このように、励起に必要な波長の2倍の波長の2光子、あるいは励起に必要な波長の3倍の波長の3倍長い光子、あるいは反応種の励起に必要な波長の4倍の波長の4光子が、活性化に使用される。

【0021】

2光子レーザー吸収または3光子レーザー吸収に、それぞれ、関連する2乗または3乗点-広がり関数（スプレッドファンクション：spread function）により、小体積の反応種だけが印加された放射エネルギーに暴露される。光子密度が高い場合、UVまたは短波長光子を吸収することができる焦点の分子は、2（または3）の近赤外光子を同時に吸収し、これにより、ラジカルまたはラジカルイオンなどの少なくとも1つの反応種が形成される。この反応種はその後反応し、あるいはラジカル、あるいはカチオン系連鎖反応を介して伝播し、これが連鎖停止段階に達するまで続き、これにより、重合または架橋領域が形成される。

【0022】

2次元または3次元物体18は、光子ビーム及び／またはステージ16を、逐一所望の構造が構築されるまで、連続して移動させ続けることにより形成される。例えば、レーザーの連続移動により、光をX-Y面上に向けてもよい。その後、ステージをZ方向に適当な量だけ移動させると、第2、第3、それ以上のX-Y層状構造が形成される。この3次元構造形成方法は、シーマ（Cima）らにより説明されている連続層形成と同様であるが、この方法では、3つの全ての面によ

り小さな特徴を有する構造を形成することができる。この方法はさらに、この形成順序に限定されず、レーザー／ステージ移動のどのような組み合わせを使用してもよい。このように、ステージの移動のみを開示しているマルオらの方法は、 $1\text{ }\mu\text{m}$ より大きな構造の形成に制限される。これはおそらく、光学機械及び他の条件によるためであり、さらに、ステージの移動が遅いからでもある。マルオらにより説明されているステージ移動を基本とする最も速い体積形成は、1、あるいは10、msあたり1ピクセルである。一方、レーザーの移動はより速く、1msあたり1ピクセルの形成のオーダーである。このように、3次元複雑度の高い構造が、より短い時間で達成可能である。

【0023】

多くの利点が、本発明にかかる多光子励起の使用により得られ、x-、y-、z-方向における新たな程度の制御ができる、バルクまたは溶液相サンプル深くでのプローブ探査が可能となり、焦点より上または下での光学的効果は最小となる。このように、多光子励起を使用すると、様々な生物分子を用いて合成することができる。というのは、赤外光、赤色光、遠赤色光、可視光照射では、UV光に比べ、IR及び赤色光の吸収及び散乱が最小に抑えられるため、焦点近傍の蛋白質、酵素、または有機分子への損傷が最小に抑えられるからである。IR及び赤色光を使用すると、組織内、あるいは血液などの混濁した媒質を通して、製作することもできる。他の利点は、活性化ゾーン（高光子密度領域）の焦点を部分的に不活性基板内または活性化が起こらない他の場所内に合わすことにより、製作される特徴のサイズを光子源の焦点よりもずっと小さな領域に制限することができることである。

【0024】

他の利点は、遠赤色、赤色、赤外及び他の可視光光学機械は、UV照射を使用する活性化の場合に比べ、より安価で、煩わしさが少ない。これらの波長で作動させるレーザーはまた、従来のUVエキシマーレーザーとは異なり、回折制限光源を提供する。UV活性化を使用すると起こりうる損傷あるいは望ましくない副反応無しで、より広い範囲の分子活性化が有効である（遠紫外）。光の伝達に光ファイバを使用することが容易で、UV関連光学機械を使用する場合に比べ、よ

り高いエネルギー、より少ないビームの広がり、より良好な視準、より少ない色の広がりが得られる。

【0025】

本発明の実行においては、現在のところ、非線形光学機械が好ましい。フリーフォームの製作においては非線形光学機械を使用すると多くの利点がある。最も重要な利点1つは、線形赤外光学機械により達成可能な領域よりも小さな領域に制限されるより高いエネルギーピーク出力が得られることである。2光子レーザー走査顕微鏡の実際の実現については、W. デンク (Denk)、J. H. ストリックラー (Strickler) 及びW. W. ウエップ (Webb) らが、サイエンス、Vol. 248、p 73 (1990) において説明している。この内容はこの中で引用され参照される。2光子励起の他の使用および説明については、O. ナカムラがオプティク (Optik)、Vol. 93、p. 39以下参照 (1993) において、O. ナカムラ及びT. タカダがオプティク、Vol. 100、p. 167以下参照 (1995) において、E. S. ウ (Wu)、J. H. ストリックラー、W. R. ハーレル (Harrell) 及びW. W. ウエップがProc. SPIE、Vol. 1398、p. 107以下参照 (1990) 及びストリックラー及びウエップに付与された米国特許第5, 289, 407号において、ワタナベ、M. オカワ、U. ウカチ、F. クリハラ、H. ハリマヤがRadTech, Japan (1993) により刊行されたRadTech Asia 1993の会報、p. 462において、さらに説明している。これらの関連箇所もまた、この中で引用され参照される。K. リーバーマン (Liebermann)、S. ハルシュ (Harush)、A. ルイス (Lewis) 及びR. コペルマン (Kopelman) による「光波長よりも小さな光源」、サイエンス、Vol. 247、pp. 61 (1990) もまたこの中で引用され参照される。

【0026】

好ましい実施の形態では、2光子広視野（遠視野）励起を使用することにより、X-Y寸法が約300nm未満で、必要に応じてZ寸法が約500nmの個々の点体積を有する構造が形成される。一方、3光子遠視野励起では、X-Y寸法が約250nm未満で、必要に応じてZ寸法が約300nmの個々の点体積を有

する構造が形成される。2光子または3光子遠視野（非線形）光学機械と共に使用するのに適した装置20の概略図が、図2に示してあり、ステージ16は開口数（NA）の高い対物レンズ22の真下に配置される。PC制御装置26は、レーザーシャッター28とステージ16の制御を行う。好ましい光子源は、Ti：サファイアレーザー25と縦に並んだアルゴンイオンポンプレーザー23を含む。光学ガルボ（galvo）スキャナ27により活性化ゾーンの微調整が可能となる。

【0027】

他の好ましい実施の形態では、2光子励起と共に4 P i 遠視野光学構成により、X-Y寸法が約250nm未満で、Z寸法が約100nmの個々の点体積を有する構造が形成される。蛍光顕微鏡と組み合わせた4 P i 光学機械については、S. ヘル（Hell）及びE. H. K. ステルツァ（Stelzer）が、「2光子励起を用いた4 P i 共焦蛍光顕微鏡による分解能の基本的な改善」、光学通信（Optics Communication）、Vol. 93、pp. 277-2828（1992）において説明している。この内容は、全体として、この中で引用され参照される。図3の装置は、この実施の形態の実行に適しており、光子源32、ステージの上及び下に配置された2つの高NAレンズ32、34を備える。第2の可動ステージ36により、光学レベル未満までレーザービームの位置の微調整が可能となり、フェムト秒の光子パルスが、一時的に製作部位で重なるように調整することができる。サンプルの上下両方の対物レンズからの励起を使用することにより、光学分解能が改良される。2つのビームは空間的にかつ時間的に正確に整合され、出力レベルは注意深く、どちらかのビーム単独で有意な励起が起こらないように調整される。

【0028】

4 P i 光学機械は、サンプルの上下両方に、対物レンズ要素を必要とする。このように、背の高いあるいは厚い物体の製作は、この点から約200 μ mまで最も高い分解能で、対物レンズ要素の作動距離により制限される。さらに、支持材料及び作製される品目は、適当な可視、赤色または赤外波長で透明でなければならない。しかしながら、この方法ではまた、2つの対物レンズ要素の共通の焦点

における高い光子密度により、優れた空間精度で非常に迅速に、非常に小さな特徴を作製することができる。このように、この実施の形態は、複雑な特徴を有する薄い物体、例えばフォトリソグラフィ用マスク、コーティング、膜、及びセンサの製造に特に有効である。

【0029】

他の実施の形態では、多光子近視野光学機械を使用することにより、X、Y、Z寸法が約50nm未満である点体積を有する構造が形成される。図4の装置40は、この実施の形態の実行に適しており、近視野光ファイバ要素42と共に結合される光ファイバカプラー42、46を備える。近視野光学励起では、励起波長よりもずっと短い距離にある小さな開口から光を用いてサンプルに信号を送ることにより、光学顕微鏡の回折制限($\lambda/2$)分解能が回避される。走査型近視野光学顕微鏡(SNOM)の制限面は、光ファイバ開口を通過する光子束である。典型的には、プローブはアルミニウムでコートされ、光は近視野に制限される。しかしながら、これらのプローブは、連続波励起の数ナノワット上の出力レベルで損傷される。コートされていないプローブは、ずっと高いレーザー出力を伝達することでき、外(エピー:epi-)照射構造において使用しても、光学回折制限より下の分解能を提供することができる。SNOMはまた、固定サンプル上のコートされていないプローブを介する連続波2光子励起を用いて説明されている。これにより、1プロトン励起(OPE)により可能なものより良好な軸方向の制限が示された。近視野製作では、例えば、コートされていない片持ちファイバプローブが使用される2光子励起が採用される。必要に応じて光学顕微鏡48がイメージング要素として提供されてもよい。この方法は、レーザまたはステージ走査により製造されるより大きな物体上に部分光学特徴(50-100nm)を書き込むのに効果的である。この技術は、単一蛋白質または酵素分子を統計的に局在化させるなどの生物学的プロセスの制御に、特に適用することができる。

【0030】

他の実施の形態では、近視野の実施の形態の光学要素を多バレル(マルチバレル:multiple-barrel)ピペット(図4の陰で示されている)と共に結合させ、認識された領域に特定の成分を非常に正確に供給させる。光供給ピペット

の内側を不透明な材料でコートすることにより、あるいはその逆に、試薬供給ピペットの内側を不透明材料でコートすることにより、多バレルピペットの1つのバレルを通して光の供給を起こしてもよい。非常に少量の材料をマイクロピペットで取ることは当分野では周知であり、例えば、シリンジポンプ、超微量シリンジポンプ、あるいはイオン導入法が挙げられるが、これらに限定されるものではない。複数の作用物質を同時にあるいは逐次供給するために、あるいは、1回以上の洗浄、作用物質の供給、再び1回以上の洗浄という順序のために、抱き合わせ（バンドルド：bundled）マイクロピペットが使用される。その代わりに、イオン導入法を用いて、より細かい（より少量の）供給を達成してもよい。供給される作用物質の量は、マイクロピペットのサイズ、または供給時間を変えることにより変更してもよい。

【0031】

様々な前駆体物質が、そのような組成が、焦点近くでの重合及びまたは架橋のために使用される放射線を実質的に吸収しない限り、本発明において使用するのに適している。実質的に透明であるため、レーザービームのより正確な焦点合わせ、望ましくない副反応の抑制が可能となる。可視、近赤外、赤外、あるいは遠赤色照射を使用することにより、焦点に隣接する前駆体への損傷が最小に抑えられる。というのは、ほとんどの有機分子、ポリマー、蛋白質、核酸、脂質の吸光度及び散乱断面は、赤色及び近IR波長では、最小であるからである。本発明にかかる前駆体溶液の反応は、バルク中（液体または固体相において）、溶液中、基板に吸着されて、あるいは懸濁液またはエマルジョン中で、起こってもよい。構造を製作するのに使用される放射線に対し、どの溶剤も、実質的に透明でなければならない。

【0032】

1つの型の適した前駆体組成物は、光開始で、（通常、フリーラジカルまたはカチオンメカニズムにより）重合可能あるいは架橋可能である。そのため、光開始可能な重合可能あるいは架橋可能前駆体組成物は、通常、フリーラジカルまたはカチオン連鎖成長工程及び連鎖停止工程が可能なモノマー、オリゴマー、及び／またはポリマー及び／または架橋剤と共に、反応を開始するための開始剤を含

む。この開始剤は、架橋剤、モノマー、オリゴマー及び／またはポリマーに、共有結合により結合してもよく、あるいは結合しなくてもよい。

【0033】

ラジカル重合に適した光開始剤としては、アゾビスイソブチロニトリルなどのアゾ化合物、過酸化ベンゾイルなどの過酸化物、ケトン及びジケトンなどの脂肪族カルボニル化合物、ベンゾフェノン及びその誘導体などの芳香族ジケトン、及び9-フルオレン-2-カルボン酸が挙げられるが、これらに限定されるものではない。他の光開始系としては、水溶液系で有効な酸化還元型光開始剤（例えば、 $\text{Fe}^{3+}\text{OH}^-$ 、及び $\text{Pb}^{2+}\text{Cl}^-$ などのイオン対）、エオシン、ローズベンガル、及びエリトロシンなどの感光染料、有機ハロゲン化物の存在下での $\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}$ などの遷移金属誘導体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0034】

適したフリーラジカル重合可能化合物としては、少なくとも1つのオレフィン（不飽和）結合を有する架橋剤、モノマー、オリゴマー及び／またはポリマー、例えば、ポリアルキレン類及びハロゲン化ポリアルキレン類、ポリアクリレート類、ポリメタクリレート類、ポリアクリルアミド類及びスチレン類を形成する架橋剤、モノマー、オリゴマー及び／またはポリマーが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0035】

カチオン重合用の光開始剤としては、複雑な金属ハロゲン化物アニオンとのリアリールスルホニウム及びジアリールヨードニウム塩類、及び複雑な金属ハロゲン化物アニオンのアレーンシクロペンタジエニル金属塩類、例えば（6-ベンゼン）（5-シクロペンタジエニル） $\text{Fe}(\text{II})$ ヘキサフルオロホスフェートが挙げられるが、これらに限定されるものではない。適したカチオン重合可能な化合物としては、シクロヘキセンオキシドなどのエポキシド類が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0036】

光重合可能な前駆体組成物はまた、この発明と共に使用するのに適している。

光重合組成物においては、各成長工程は、入射放射線の影響を受け、光重合は、ビスアリールアジドなどの光架橋剤または光架橋可能なオリゴマー及びポリマーを用いて達成しても良い。そのようなオリゴマー及びポリマーは、互いに、光誘起化学結合を受ける発色基を含む。発色基は、ポリマーバックボーン内に存在しても良く、例えばバックボーンカルコン基、あるいは吊り下がっていても良く、例えばポリ（ビニル桂皮酸）である。

【0037】

適した前駆体の上記説明は、便宜上の目的のみにより、反応機構により分類される。他の重合可能なあるいは架橋可能な前駆体もまた、それだけで、あるいは他の光開始剤と共に組合され、それらは本発明の範囲内にあり、重合の正確な機構（例えば、ラジカル重合、一電子重合、あるいは光重合）は明確には知られていない。このように、本質的には、光活性化され、中間の架橋剤と共にあるいは無しで、製作される構成と共に架橋を形成し、焦点の外側では放射線に対し実質的に透明である前駆体組成はいずれも本発明の範囲内にある。そのような前駆体としては、上述の、あるいは他の有機モノマー（染料及びキラル種を含む）、オリゴマー及びポリマー（生物ポリマーを含む）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0038】

生物学的モノマー及びポリマーは特に興味ぶかく、アミノ酸類、ペプチド類、蛋白質類；脂肪酸類及び脂質類；ヌクレオチド類、オリゴヌクレオチド類、及びそれらの合成類似物質；核酸類；糖類及び炭水化物類；サイトカイン類、ホルモン類、レセプター類、成長因子類、薬物などの生物活性作用物質；光活性合成作用物質（無機化合物を含む）；ケージ化合物及び発蛍光団などの光活性生物化合物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの分子はナノ製作には容易には適さない、というのは、これらの分子はUV光にしばしば感応し、溶液中で反応させなくてはならないからである。これらの問題は、この発明により解決される。

【0039】

以下の実施例で説明されるように、様々な構造の多くの有機ポリマーが製作さ

れている。ポリウレタン構造は、ノーランド (Norland) からオプティカルアドヒーズブ (Optical Adhesive) # 83Hという商標名で市販されている光接着剤製品を用いて組立てられ、架橋されている (図5, 6, 7A-B)。図5は、実施例1で説明されているポリウレタン前駆体水溶液の2光子誘起重合により形成された複数のポリウレタンロッドのSEM像である。図6は、2光子励起により製作したポリウレタンシートの走査型電子顕微鏡写真である。製作後直ちに透過光顕微鏡を用いて行った観察に基づくと、シートは製作時には単一であった。このように、SEMにおいて観察されるでこぼこは、SEMイメージングのための調製において、洗浄及び空気乾燥により引き起こされた人為構造である。最後に、図7A及び7Bは、ポリウレタン前駆体の2光子励起を用いて製作されたピラミッド構造の連続層構造を示す、低倍率 (7A)、高倍率 (7B) でのSEM像である。

【0040】

トリメチロールプロパントリアクリレートは、ローズベンガル (2光子励起) またはフルオレノン (3光子励起) と共に重合されている。図8は、9-フルオレノン-2-カルボン酸及びトリエタノールアミンの存在下、3光子活性化により重合されたトリメチロールトリアクリレートのロッドにより形成された格子の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像である。図9は、多格子励起により製作された重合トリメチロールトリアクリレートシートの積層された層の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像である。像中のトップ層は、SEM用に調製する間に後に剥がれ、内側の層状構造が現れている。製作は、トリエタノールアミンの存在下、9-フルオレノン-2-カルボン酸の3光子活性化により開始された。

【0041】

いくつかの活性化剤の存在下、2光子励起を用いるアクリルアミドの重合は、図10の3次元構造を製作するのに使用されている。この図では、40%のポリアクリルアミドの3層から製作されたピラミッドが示されている。

【0042】

製作はまた、生物学的に活性な分子を用いて説明されている。水溶液中のウシ血清アルブミン (BSA、可溶性球状血漿蛋白質) は、ローズベンガルの存在下

(図11, 12, 14) 及び光開始剤 9-フルオレノン-2-カルボン酸及びトリエタノールアミンの存在下 (図13) において、重合されて、合成構成となる。図11は、重合されたウシ血清アルブミン (垂直線) 及びポリウレタン (水平線) を含む複合格子のSEM像である。図12は、テキサスレッド (分子プローブ) を用いて標識したBSAの幾つかのロッドを示す蛍光顕微鏡写真である。ロッドは、活性化剤としてローズベンガルを用いて、BSAの水溶液から2光子励起により製作された。図13A (低倍率) 及び13B (高倍率) は、9-フルオレノン-2-カルボン酸及びトリエタノールアミンの存在下、3光子励起により形成されたロッドのSEM像である。図14は、ローズベンガルの存在下、2光子活性化を用いて重合BSAから製作したピラミッドのSEM像である。

【0043】

形成された構成の最終的な寸法及び重合または架橋度、最終構造の最終的な特性及び寸法には多くの因子が影響する。このような因子はしばしば相互に関係付けられ、例えば、焦点のサイズ、前駆体の正体、架橋またはポリマー形成のメカニズム、反応基の置換パターン、中間体の安定性、中間体または前駆体の拡散、競争反応、反応促進剤または阻害剤の存在、などが挙げられる。例えば、理論に縛られずに、より小さな構造寸法は、より安定でない反応中間体が生成されると、あるいは連鎖成長反応の数が制限されると、本発明の方法により得られると仮定される。より大きな構造は、より安定な中間体を使用して合成しても良く、これにより、ラジカル種の1つまたは組み合わせがレーザーの焦点から拡散して離れることができ、あるいは連鎖重合がレーザーの焦点を超えて起こることができ、連鎖停止工程が起きた時のみ終結する。より小さな種はまた、レーザーの焦点を超えて拡散することがあり、これにより最終的により大きな構造が得られる。部分的に、他の不活性な位置の不活性基質内にある光子密度の焦点により、より小さな構成が得られるであろう。

【0044】

しかしながら、ポリウレタンとアルブミンの場合、フリーラジカル (あるいは一電子) 重合または架橋が起きてもよいが、形成されるフリーラジカルの不安定性または連鎖停止工程のエネルギー学的な優待性のため、限られた程度までのみ

起こすことができる。その代わりに、光重合のみが起きても良く、これは本来レーザーの焦点に限定されるものである。とにかく、形成された構造のサイズは、レーザー焦点のサイズだけでなく、前駆体組成物の性質にも依存し、安定性の低いラジカルまたは他の中間体により、より小さな寸法を有する構造が得られる。

【0045】

本発明の重大な利点は、ほとんど制限のない形状を有するマイクロ及びナノサイズの構造の製作が可能なことである。上述したように、2次元または3次元物体は、レーザービーム及び／または反応種を含むステージを連続的に移動させ、それを所望の構造が逐一形成されるまで続けることにより形成される。このように、最終構造の形態は、少なくとも部分的には、重合のために使用するビームまたはステージの位置制御に依存する。

【0046】

前駆体を逐次変化させることにより、複数の材料を含む物体も製作することができる。その代わりに、異なる波長感度を有する前駆体を、1つの可変波長レーザーまたは複数のレーザーと共に使用してもよい。波長を変えることにより、同時に2以上の構成要素の選択製作が可能となる（このプロセスは、図1に概略が示されている）。本発明の製作方法は、また、他の製作方法、例えば、光学的にナノ製作されたケージ、ゲル、またはマトリクス内での化合物の物理的トラッピングと共に使用してもよい。

【0047】

1つの実施の形態では、多光子フリーフォーム製作が使用されて、活性な（好ましくは生物活性な）作用物質が3次元光架橋及び／または光重合されたゲルまたは構成中に配置され、このゲルまたは構成は、制御された放出、分解及び／または拡散特性を有する。そのように配置することができる生物活性作用物質としては、成長因子類、ヌクレオチド類（DNA、RNA、アンチセンス）、イオン類、緩衝薬、染料類、蛋白質類、ペプチド類、炭水化物類、グリコサミノグリカン類、酵素類、ヌクレオチド類、リポソーム類、細胞及び薬物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。作用物質または作用物質類の構成からの拡散は、制御された放出が実行されるように、あるいはトラップされた作用物質また

は作用物質類を暴露させ、あるいはそうでなければ構成表面または他の界面に運び、生物活性を可能とするように調整される。拡散は、1つの方法または方法の組み合わせにより、例えば、作用物質または作用物質類の構成に対する親和性の制御、構成の架橋密度の程度の制御、あるいは構成の分解速度の制御により、制御される。作用物質または作用物質類の構成に対する親和性の程度の制御は、構成成分、例えばバックボーン及び／または架橋成分の適当な選択により達成してもよい。異なる架橋部分の使用により、2以上の作用物質の相対的な親和性の調整が可能となる。異なる構成親和性を有する作用物質のエントラップメントにより異なる速度での制御された放出が可能となる。

【0048】

拡散及び分解特性の制御は、局所的に架橋または重合密度を変化させることにより、化学的に均一なゲル内で最も容易に達成される。これはまた、照射時間、強度（光子エネルギー密度）を変化させることにより、及び／または、ゲルの空間寸法の変動、トラップされた試薬を含まないゲルのオーバー層の追加、他の3次元パターンニングを含む、ゲル構造を変えることにより達成してもよい。拡散及び分解の制御はまた、ゲルの化学的性質を変化させることにより、例えば、異なるモノマーを用い架橋化学的性質を変化させることにより、及び他の反応成分を変化させることにより、重合または架橋速度を変化させることにより、達成させることができる。

【0049】

他の実施の形態では、多光子フリーフォーム製作が使用されて、活性な（好ましくは生物活性な）作用物質が、3次元光架橋及び／または光重合ゲルまたは構成内により永久的に配置される。アルカリホスファターゼが、実施例7で説明されているようにポリアクリルアミドゲル内にトラップされている。より密度の高いゲルは縁からゲル内への試薬の拡散を阻害する。酵素活性はまた、構成が基板により接近して接触している領域では減少する。試薬の拡散はこれらの領域では阻害されると仮定される。

【0050】

この実施の形態の1つの型では、そのようなトラップされた作用物質には、ゲ

ルまたは構成体内に拡散する分子上で、その分子がゲルまたは構成体から拡散して出て行くまで連続的に作用する酵素が含まれる。他の型では、そのようなトラップされた作用物質には、ゲル内に拡散する分子上で作用し、この作用によりゲルまたは構成体から離れることができない、トラップされた酵素、キレート化剤、または他の分子が含まれる。トラップされた作用物質は、濾過またはトラップ機能を提供し、この機能はバイオセンサ及び他の検出への適用において有効であるかもしれない。この実施の形態の他の型では、そのようなトラップされた作用物質として、トラップされた運動性蛋白質類、ペプチド類、あるいは、特定の分子、イオンまたは他の作用物質がゲル内に拡散すると製作された構成が振動し、形状が変化し、拡散特性が変化することができるようにする非生物化学構造が挙げられる。この実施の形態の他の型では、そのようなトラップされた作用物質としては、所定の波長、偏光または他の光の状態で照射されると、色、屈折、拡散、輸送、形状または他の物理特性あるいは生物化学活性を変化させるトラップされた光力学的分子が挙げられる。この実施の形態の他の型では、そのようなトラップされた作用物質として、イオン、pH、生物分子などのゲルまたは他の構成体内に拡散する化学作用物質の活性により、色、屈折、拡散、輸送または他の物理的及び／または生物化学的特性を変化させるトラップされた化学活性分子が含まれる。

【0051】

トラップされた蛋白質を含むゲルの製造は特に、ナノメートルからマイクロメートルスケールで機能する検出及び分離システムの製作に有効である。この型の製作されたゲルの例としては、ナノオクタローニー (Ochterlony) 一様免疫拡散アッセイ (抗原-抗体沈降に対する)、ナノスケールポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) ゲル、光学的に製作されたナノスケールの勾配密度を有する PAGE ゲル、及びサザンブロット、ウエスタンブロット、ノーザンブロット及びポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) ウェルなどのナノスケール分離及び検出システムからなる群から選択される蛋白質類のエントラップメントが含まれる。

【0052】

特に、生細胞のエントラップメント (またはエンキャプシュレーション) は、

組織工学、細胞培養、細胞バイオリアクター及び検出（バイオセンサ）システムにおいて適用できる。そのようなエンタラップメントは一時的なものでも永久的なものでもよい。多光子顕微鏡の細胞の生存度に対する影響は、一般に、使用される波長が長く、励起ゾーンが空間的に高い制限を受けるため、最小である。このように、製作の光学的側面は、細胞エンタラップメントに大きな妨害を与えないように思われる。

【0053】

エンタラップメントには、構成、例えばゲルまたは足場などの構成内での細胞の物理的エンタラップメント、細胞表面の構成への化学的架橋あるいは1つの細胞の他の細胞への架橋の両方が含まれる。細胞のエンキャプシュレーションは、細胞の周囲での構成の重合によるものである。必要であれば、光損傷の可能性は、そのようにトラップされる細胞に直接接触せずに細胞の周りに「箱（ボックス）」を構築することにより、最小に抑えられる。製作のための光学ゾーンは数百ナノメートルに限られており、これは、1つの細胞よりもずっと小さいので、光励起は特定の細胞領域に限定することができる。このように、この発明は、直接構成を、例えば、細胞表面糖蛋白質類に直接結合させることにより、細胞を構成に直接架橋させるまたは「つなぐ」ことを含む。これにより、足場上に細胞を確実に配置する手段が提供される。この適用のための好ましい細胞は、丈夫な細胞壁を有する細胞、例えば、細菌及び植物細胞である。多光子励起はまた、トラップされている細胞内または細胞間の架橋を提供するのに使用してもよい。

【0054】

他の実施の形態では、多光子励起を用いて、複雑な組織、化学的性質、あるいは生物化学的性質を有する材料の表面が修飾される、あるいは複雑な組織、化学的性質、あるいは生物化学的性質が表面に提供される。例示的な表面修飾としては、多光子媒介架橋による細胞表面への活性作用物質の直接付着が挙げられる。これにより、作用物質の特定の細胞への供給が容易になり、飲作用プロセスにより補われ、これらの作用物質は細胞内に取り込まれる。他の実施例は、1以上の生物活性機能または検出要素を、集積回路や他のデバイスなどの基板に追加するものである。そのような機能または要素の細密な位置決めを、装置の顕微鏡部分

を用いて行う点に、この技術の重要な利点がある。そのような表面修飾の例は、血小板の付着用のフィブリノーゲンの足場の製作である。図15Aは、架橋したフィブリノーゲンを含む線に付着したヒト血小板のSEM像であり、このフィブリノーゲン自体が、製作されたアルブミンの長方形領域のトップ上で製作される。ほとんど全ての血小板が、フィブリノーゲン特徴に付着し、あるいはフィブリノーゲンに付着する他の血小板に付着している。BSAバックグラウンドに付着した血小板は最小の拡散を示す。対照的に図15Bでは、BSAまたはフィブリノーゲン構成を有しておらず、ランダムな付着パターンが現れ、広範な血小板拡散が見られる。

【0055】

表面修飾を採用するとりわけ有効な適用は、組織細胞培養と共に使用するためのバイオミメティックな表面の製造であり、とりわけ、内皮下及び外皮下細胞外マトリクス及び基底膜などの生物組織、及び他の組織トポグラフィーを模写する表面の提供である。米国特許第5,380,589号及び5,700,241号が、このことについて、関連している。骨インプラントの表面は、フィンク (Fink) らに付与された米国特許第5,370,692号において説明されているように修飾されてもよい。この内容はこの中で引用され参照される。

【0056】

多光子励起を用いた表面修飾の他の例は、空間的に組織化されるように、例えば、製作された構成にキネシン、微小管、アクチン、アキソネム、鞭毛、または他の運動性構造体を付着させることにより、運動性蛋白質を用いてマイクロマシンを製造するものである。これは、繊毛のある表面、または分子を所望の経路に沿って輸送する装置を製造するのに使用され、あるいは生物化学的駆動メカニズムを使用して移動する装置を製造するのに使用される。

【0057】

他の実施の形態では、多光子製作が使用されて、バイオセンサ、環境センサ及び化学センサが製造される。例えば、抗体またはオリゴヌクレオチドを使用するバイオセンサアレイチップの概略図を、図16に示す。現在の技術では、1平方センチメートルあたり 1.5×10^3 のアッセイ部位を達成することができる。

この発明のナノ製作技術は、控えめに言っても、多光子励起を用い、2次元で、 1.6×10^9 アッセイ部位/ cm^2 の密度を達成することができ、あるいは、控えめに言っても、多光子励起を用い、3次元で、 6.4×10^{11} アッセイ部位/ cm^2 までの密度を達成することができる。ロックハート (Lockhart) らに付与された米国特許第5,556,752号は、スクリーニングのために有効な固体支持体上の二本鎖オリゴヌクレオチドの1つのアレイが開示されている。この内容はこの中で引用され参照される。

【0058】

他の実施の形態では、この発明は、基板に対する、あるいは製造された構成内における、酵素、抗体、レセプター、リボソームなどの空間的な配向を提供し、そのような組立てから有効な生物化学的または化学的な仕事を生成するように使用される。これらの「生物化学工場」は、全体の組織または人口品において、新規構造が生成されるという意味で、バイオミメティックでもよい。このような工場は酵素のアレイを含み、電子伝達を実行し、生物化学合成を実行し、分離を実行し、溶液中の生物分子を特定の配向を有する製作装置内の生物分子と相互作用させる。

【0059】

適当な空間及び生物化学組織を用いた製作により、幾つかの酵素は、合成、分解、輸送、形質導入、及び／または他の機能のために、添加された反応物上で順番に作用することができる。製作中に酵素の適当な配向などを達成するために、静電場及び磁場、せん断力、レーザーピンセット及び磁気ピンセットなどの外力を印加してもよい。適した配向は、また、チャペロン (chaperone) などの他の分子を用いることによる自己組織化を認めることにより、及びフレキシブルなつながりを用いて酵素などを基板に結合させることにより、容易になる。他の方法は、溶解性巨大分子を結合させ、溶液中で構造を互いに連結させ、その後、全ユニットを所望のように製作された装置に連結させ、それから、巨大分子配位子の放出を行った。巨大分子配位子の放出は、イオン強度の変更、可溶性酵素の使用、あるいは他のプロセスにより、媒介されても良く、これにより、所望の分子が、適当な配向で表面上に残され、配位子が結合される。

【0060】

他の実施の形態では、多光子励起が使用され、外植された組織が再移植する前に、修飾される。生体外での組織修飾では、例えば、同種移植、異型移植または異種移植により、組織がまず除去される。除去された組織の特性はその後、適した架橋剤を用いた多光子励起による架橋を実行することにより、及び／または、作用物質内で拡散させ特異的に活性を組み入れる、または他の処理を実行することにより、修飾される。その後、組織は移植され、あるいは他に使用される。この方法の特定の例は、物理的特性の改良、及び組織ベースの異種心臓弁の潜在的な感染及び石灰化の減少である。強度の増加、可撓性の変化、あるいはアルデヒドに対する必要性の減少または排除及び他の化学的な架橋固定などの他の特性の改良が、多光子励起を用いて架橋を所定の領域に選択的に組み入れることにより達成される。異種組織に作用物質（例えばキレート化剤）または抗菌性物質を組み入れることにより、それぞれ、石灰化の減少、感染性の減少が得られる。

【0061】

他の実施の形態では、多光子励起が使用されて、多重製造のための鋳型、スタンパー、マスクまたは他の型が製作される。特に、現在市販されているものよりも小さな寸法を有するフォトリソグラフィーマスクがこの方法により得られる。現在のところ、約150nmの範囲の特徴を有する研究目的の高解像度マスクは非常に高価である。この技術により、同等のサイズのあるいはより小さな特徴を有する、及び複数の前駆体の型を有するそのようなマスクの迅速で効率のよい製造が可能となる。この型の他の適用は、組織培養、組織工学、生物材料のためのバイオミメティックな細胞外基質組織化表面用の表面鋳型である。

【0062】

図17は、X-Y方向におけるガルボ走査及びガルボ走査移動を用いて達成可能な広範囲のトポロジーを示したものであり、(A)連続ファイバ出力、(B)パルスファイバ出力（例えば、ビームシャッターリングによる）である。他の実施の形態では、多光子励起による製作が使用されて、図17に示された例示的な構造（及び他の構造）の重合時の収縮または膨張効果が制御される。また、多光子励起による製作が使用されて、より単純な2次元前駆体からより複雑な3次元構

造体が作成されてもよい。構造の複雑度は、照射強度、化学的性質、走査時間、走査パターンを変化させることによりゲル／ポリマー密度を変化させることにより達成されてもよい。例えば、図18は、ポリアクリルアミドの2光子製作により形成された約350nmの線厚を有する一連のらせんの透過光顕微鏡像である。製作は、直線をバルクモノマー溶液中で走査させることによるものであった。重合時のアクリルアミド体積の減少により、線がねじれらせんとなった。空間振動数は、ドウェル (dwell) 時間を変化させることにより異なる架橋密度を光学的に誘起することにより、及び基板と部分的に接触させることにより物理的にらせんを束縛することにより、変化させた。「二重らせん」(図18の上から三番め)は、1つのらせんをもう1つのらせんの内側に配置しようとする試みから生じたものである。

【0063】

他の実施の形態では、ポアソン比効果、制御された収縮／膨張効果を用いることにより、及び／または化学官能基、蛋白質及び他の要素を重合または架橋により膨張しあるいはそうでなければ形状変化する前駆体組成物何組み入れることにより、形成された物体内で力学的形状変化が達成される。そのような要素には、必要に応じて、「スマートな」ポリマーまたは生物ポリマー、例えば、酵素や運動性蛋白質が含まれ、これらは、媒質条件（例えば、温度、溶剤、イオン強度、特定の配位子の添加）が変化すると形状が変化する（例えば、曲がる、伸長する、収縮する、移動するまたはコイル状となる）。そのような材料は、アクチュエータとして使用してもよく、すなわち、動力学的に形状を変化させ、物理的力を働かせ、流体流を変動させ、あるいは他の特性を変化させるのに使用してもよい。この方法の例として、ナノ製作したロッドの端にチューブユリン (tubulin) モノマーを配置し、動的細胞骨格様要素を作製することにより生物合成機械構造を製造してもよく、動原体を組み入れて微小管を形成してもよく、あるいはプロフィリンを組み入れてアクチンを形成してもよい。さらに、構造の形状変化を使用して、孔を開けても閉じてもよく（すなわち、可変フィルタとして作用するように）、あるいは1以上の抗体または細胞表面レセプター配位子などの活性機能を暴露させてもよい。そのような構造は第2の機能要素として、抗原または特性の

細胞を「トラップ」する。

【0064】

他の実施の形態では、図19に示されるように、増感剤及び化学架橋剤を添加せずに、直接蛋白質架橋を行うために多光子励起が使用される。芳香族残基を含む蛋白質またはペプチドの π から π^* への遷移(266nm)は、100フェムト秒パルス幅の3つの800nm光子の同時吸収により励起される。この励起後、第2の時間遅れビームにより、イオン化限界より上に、発色団が励起される。これは、800nmの2光子プロセスにより、あるいは400nmの1光子により行われる。一時的に、発色団は双性イオンを形成し、このイオンは第2の蛋白質またはペプチドに共有結合により結合する。多光子吸収プロセスの電力依存性により、顕微鏡スケールで、活性化の3次元制限が導かれる。そのような制限は、最初の3光子プロセスにより規定され、そのため、第2の工程は1以上の光子励起と同様の意味合いで進行してもよい。

【0065】

この発明の方法はさらに、特定の組織を有するキラル及び光学的に活性な化合物を用いて、層状の、及び他の2次元及び3次元構造の光学装置を製造するために使用される。ほとんどの可視光学波長よりも小さな要素の組立てのおかげで、そのような組立て品は、回折、屈折を変化させ、光導波管となり、そうでなければ、光学特性を操作するのに有効である。

【0066】

他の実施の形態では、少なくとも1つの光ファイバ要素が使用されて、そうでなければアクセスすることができない位置での多光子励起によるナノ製作が、好ましくは、カテーテルと組合された製作装置を使用して、実行される。図20Aに概略が示されているように、光子源、好ましくはTi:サファイアレーザ25と組合されたアルゴンイオンパルスレーザ23が、光ファイバカップラー25を介して、赤色または赤外光を単一モード光ファイバ54内に送りこむ。群速度遅延自己位相変調(GVD/SPM)補償装置58が使用されて、光学的な分散が補償され、ファイバ内でのスペクトルの広がり最小に抑えられる。光ファイバは可撓性管内に配置され、支持と保護が提供される。医療への適用では、この管

は、カテーテル60とすることができ、内臓へのアクセスが可能となる。図20Bは、カテーテル50の断面の詳細を示したものであり、光ファイバ54用のカテーテルハウジング62と、試薬管68とを備える。単一モードファイバ54が、光ファイバカップラー64を介してレンズ66に結合され、このレンズにより多光子製作プロセスに必要な微小点に焦点が合わせられる。レンズ66の開口数(NA)は、多光子活性化のための領域サイズ及光子密度を達成するためには、水溶液浸漬適用では、0.1NAから1.2NAまでの範囲内であればどのようなものでもよく、例えば、生体内で遭遇するようなものである。

【0067】

製作が望まれる点からの焦点距離にレンズを配置するためには、幾つかのメカニズムを使用してもよい。この空間を提供するためにカウリング(cowling)70が使用されてもよい。その代わりに、カテーテルを介してイメージング能力を組み入れ、光学機械手段を提供し、アセンブリを移動させることにより空間を供給してもよく、焦点距離が調整され、及び／またはビームが走査される。組立て及び製作用の試薬は、カテーテル内の試薬管68を介して導入されてもよい。複数のそのような試薬管を用いて、複数の化合物が供給され、多成分構成の製作が可能となり、異なる位置に異なる機能を提供することができる。製作の他に、多光子プロセスはまた、表面を清浄にすることが望ましい場合に、あるいは他の試薬を適用する前の準備手順として、剥離のために使用してもよい。そのようなカテーテルまたは光ファイバシステムは、最小侵襲性血管及び他の外科的処置、歯科医術、及び、人工の構造体及び機器内のパイプ及び導管の修理用などの他の適用において使用される。

【0068】

カテーテル内の単一モード光ファイバを用いるビーム走査を提供するに、2つの方法を使用してもよい。1つは、ファイバを基本としない装置においてされているけれども、鏡70(走査検流計)の使用である。2番目(図20)は、より簡単であり、ファイバは対物レンズの後の焦点面内を移動する。単一モードファイバは3 μ mの開口を有し、結合効率は約50%である。近視野光ファイバプローブについて以上で説明したように、ポストレーザプリズムまたは回折格子対が

、ファイバ内のGVD及びSPMを補償するために使用される。

【0069】

この装置は基本的には光ファイバ顕微鏡であるので、この特徴が利用されて、製作開始前に、1つの領域の像が映される。例えば、装置は走査型顕微鏡として使用され、最小侵襲性法により *in situ* で、損傷を受けた組織（例えば、傷、慢性のただれ、角膜の欠損あるいは裂傷した関節軟骨）の像が示される。像は、高い反射率を有する歯や他の硬い組織に対し適しているように、反射モードで得られてもよく、あるいは、反射率の低い柔らかい組織では、多光子蛍光イメージングを用いてもよい。ローズベンガル、エオシン及びエリトロシンは、例示的な非特異的蛍光ラベルである。というのは、これらは拡散性で、無毒で、製作のための光開始剤としても適しているからである。他の試薬及び固有蛍光を使用してもよい。

【0070】

in situ 組織修復には、走査型顕微鏡として光ファイバ装置システムが使用され、損傷された組織内の外傷が3次元で画像化される工程であって、該画像化は、2光子画像化を用い反射モード（共焦）及び／または蛍光モードである工程と、共焦／3光子像を用いて損傷の3次元デジタルマップを作成し修復のための計画を計算する工程と、直接走査システムを用いて修復サブユニット配置する工程と、必要に応じて、修復材料の縁を周囲の組織に架橋させその材料を定位に固く保持させる工程と、を含む。

【0071】

多光子製作方法は、生体外及び *in situ* システムの両方において、組織内のある深さで製作するのに使用することができる。ほとんどの軟組織は、近IRにおいてかなりの伝達を示すので、組織修飾は、軟組織、例えば皮膚及び歯肉内の約350 μm の深さまで行うことができる。（毒性の低い）製作用材料は、その後、低分子量前駆体の形で組織内に拡散される。有効製作深さに影響する因子は、製作用材料の拡散、振動数の4乗として表されるレイリー散乱、及び長い作動距離での光子密度、これはレーザ出力と開口数の関数である、である。このため、かなりの深さを達成するには近赤外光を使用するのが好都合である。

【0072】

*in situ*で及び表面下で製作することができる能力は、医学及び歯科学において広く適用されてもよい。いくつかの例としては、a) アンチセンス、抗血管形成化合物、細胞毒の直接腫瘍内または腫瘍上への供給、この場合、必要に応じて、制御された放出处方または構成で供給される、b) 組織光学足場作用物質、成長因子、及び細胞を、i) 慢性のただれにおいて傷の治癒を容易にする、ii) 損傷された関節軟骨における軟骨細胞成長のためのマトリクスを提供するために、制御して供給するための装置の使用、c) 溝空間で直接光学製作を実行するために、抗菌剤、成長因子及び他の作用物質を最小侵襲性アプローチにおいて病気にかかった組織に供給し付着させるために、あるいは病気の及び損傷した歯肉及び他の上皮外傷に治療薬を供給するために、腫瘍を殺し、慢性の傷の治癒を促進するために、歯肉に対し配置された光ファイバ装置をもちいて行うマトリクスの製作、d) 例えば、J. ブハワルカー (Bhawalkar) 及びN. クマール (Kumar) らの「2光子光力学治療」と題する、臨床レーザー医学&外科治療ジャーナル、Vol. 15, pp. 201-204 (1997) により開示されているような、*in situ*光力学治療、e) 例えば、関節軟骨の誘導再生及び／または軟骨細胞の再生マトリクス内への同時エンタラップメントのためのマトリクスの*in situ*製作、f) 皮膚、角膜及び表面のまたは表面下の他の組織における上皮傷修復のための足場の製作、g) 腱の回復、修復あるいは強化及び靱帯結合のための最小侵襲性足場の組立て、h) 心臓血管医療のための最小侵襲性再建による尿閉または出血性動脈の部位指定修復及び再構築、i) 放出が制御された薬剤及び生物活性作用物質の悪疫、腫瘍、外傷及び慢性の傷への供給、及びj) ステントなどの構造要素または装置の最小侵襲性組立てが含まれる。

【0073】

光ファイバ中へのファイバ結合のための構成は、連続波またはナノ秒パルスレーザーに対しては簡単であるが、フェムト秒レーザーではずっと複雑になる。群速度分散 (GVD) 及び自己位相変調 (SPM) の両方が、短レーザーパルスを結合させるのに考慮されなければならない。GVDは、光がシリカファイバなどの分散媒質を通して進む場合に起こる。単色光では、この問題は無視できる。しかし

ながら、100フェムト秒のレーザパルスは、約10nm半値全幅（FWHM）のスペクトル幅を有し、その成分は典型的には、ファイバ内で異なる屈折率を有し、正振動数「チャープ（chirp）」となり、ここでは赤い成分が青い成分よりも速く進む。長いファイバを通して伝播した後、パルスは広がり数ピコ秒となる。SPMは、高いピーク電力のスペクトル的に広がったパルスがきちんと焦点合わせされ、10μm単一モード偏り保存ファイバにされると、起こる。ピーク電力は屈折率を変調させ、振動数成分を赤色及び青色に添加し、10nmスペクトル幅はかなり広がる。解決策は、格子対を用いてパルスを予めチャープさせることであり、これにより負の分散が提供され、ピーク電力が減少し、これによりSPMが最小に抑えられる。ファイバプローブの正の分散により、パルスは近100フェムト秒に再圧縮される。2次及び3次分散の両方共が、適当な光学機械を選択することにより、このプロセスにより補償されることが可能であり、これについては最近、ルイス（Lewis）らにより証明された。顕微鏡は、この実施形態を実行するための装置の一体化された一部であるので、多光子製作された特徴または装置を組織の表面上または組織内に正しく配置することは、容易に達成することができる。

【0074】

上述の実施の形態はまた、所望であれば、複雑な装置及び構造を生成するために結合させてもよい。例えば、酵素、運動性蛋白質、及び光学特性の組み合わせを備えた装置を、バイオセンサ適用に使用してもよい。組織損傷のカテーテル方式の修復に、あるいは腫瘍を殺すために生物分解可能な化合物を供給するために、光ファイバ製作システムを使用してもよい。

【0075】

この発明についてさらに以下の実施例により説明するが、これらの実施例は限定するものではない。

【0076】

装置

以下の実施の例で使用する装置の概略を図21に示す。この装置は、コンピュータ26を有する修飾バイオラッド（BioRad）レーザ走査共焦顕微鏡（バイオラ

ッド MRC600) と、ガルボスキャナ27と、ステージ16上に焦点を合わせるための0.5-1.4対物レンズ22と、を備える。製作は、光電子増倍管82及び／または集光レンズ84と光電子増倍管86により、蛍光検出を用いてモニタする。顕微鏡には、フェムト秒チタン：サファイアレーザ80（コヒーレント ミラ 900-F）が取付けられている。

【0077】

実施例1. UV-活性化ポリウレタン系接着剤前駆体系の反応

ポリウレタン系光接着剤前駆体系を、ノーランドプロダクト社（Norland Products Inc.）、N. ブルンスウィック、NJから、ノーランドオプティカルアドヒーズ83Hという商標名で、入手した。この接着剤系は、普通、320-380nmで、365nmのピーク強度を有するUV光に接着剤前駆体を暴露することにより、活性化される。接着剤前駆体はステージ上の顕微鏡スライド上に配置され、このステージは手動によりX-Y面内で走査させることができた。焦点が合わせされたビームは、波長790または785nm、パルス長100フェムト秒、平均出力10mWで、76メガヘルツ（MHz）繰り返し速度で、前駆体上で走査させた。バイオラッドレーザ走査共焦顕微鏡の検流計スキャナを使用して、0.5または0.75NAの20倍倍率のツァイスネオフルオア（Zeiss Neofluor）対物レンズを通して、約600μmの長さの線に沿って、焦点が合わせられた回折制限スポットを導いた。製作を行うために、走査線を最低約100回、引き及び再び引いた。ロッドは直ちに、約1-2秒で製作された。製作後、エタノールとアセトンを用いた洗浄により、未反応樹脂が構造から除去された。その後、サンプルを空気乾燥させ、10nmのAuPdでスパッタコートし、走査型電子顕微鏡用に準備を行った。

【0078】

図5は、上記方法により製造したいくらかのポリウレタンロッドのSEM像である。図6は、上記方法により製造したポリウレタンシートの走査型電子顕微鏡写真である（シートの折りは、SEMサンプル準備の人為構造である）。図7A及び7Bは、ピラミッド構造を示した図である。

【0079】

実施例2. ウシ血清アルブミン (BSA) の重合

ウシ血清アルブミンを水に溶解し、濃度 10 mg/mL とした。それから、 1 mL の BSA 溶液を 0.5 mL のトリエタノールアミン (TEA) に添加し、光開始剤ローズベンガル、約 1×10^{-4} とした。十分な水酸化カリウム水溶液を添加し、光開始剤を溶解するために、わずかに塩基性の混合物を生成させた。その後、この溶液に、実施例1で説明したように2光子励起を受けさせ、重合させた。重合はまた、トリエタノールアミン無しで、ローズベンガルの存在下、2光子励起により達成した。図12および14は、それぞれ、2光子励起により製作されたロッド及びピラミッドを示す図である。

【0080】

3光子励起のために、ローズベンガルを約 1 mg の9-フルオレノンカルボン酸に換えて、上記溶液を調製した。この溶液の他のアリコートステージ上の顕微鏡スライド上に置き、焦点を合わせたビームを 780 nm の波長、 100 フェムト秒 のパルス長で、溶液上で走査させた。バイオラッドレーザ走査共焦顕微鏡の検流計スキャナを用いて、焦点が合わされたスポットを約 $600 \mu\text{m}$ の長さの線に沿って誘導した。 $0.5 \text{ NA } 20 \times$ ツァイスネオフルオア (Zeiss Neofluor) 対物レンズを使用した。平均出力レベルは、定位置に対物レンズを配置せずに測定すると、 76 MHz 繰り返し速さで 130 mW であり、対物レンズを通過するエネルギー損失は約 25 mW であると評価された。製作には、約1-2秒の光学的に目に見える製作に必要な総ドウェル時間で、最低100回の走査線の線引き、再線引きが必要であった。 780 nm の波長は、フルオレノン光開始剤の3光子励起を表し、この開始剤は、約 270 nm の $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移に対する1光子吸収極大を有する。1重項に励起されると、フルオレノンは直ちに三重項に変換され、水素引抜きを介して架橋が開始される。

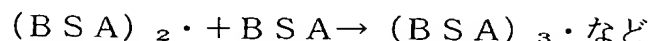
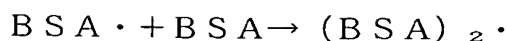
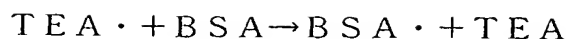
【0081】

(1) フルオレノン (三重項) + BSA \rightarrow BSA \cdot + H

BSA \cdot + BSA \rightarrow (BSA) $_2\cdot$

(BSA) $_2\cdot$ + BSA \rightarrow (BSA) $_3\cdot$ など

(2) フルオレノン (三重項) + TEA \rightarrow TEA \cdot + H



トリエタノールアミンラジカルの動力学的安定性の増加は、架橋反応の効率の増加に寄与するかもしれない。図13A、(低倍率)及び13B(高倍率)は、BSAの3光子重合により製造したロッドのSEM像であり、このロッドの直径は約500nmである。

【0082】

実施例3. トリメチロールプロパントリメタクリレート重合

トリメチロールプロパントリメタクリレート(アルドリッチ)をローズベンガル 1×10^{-5} 、トリエタノールアミン0.1Mとし、約1滴のジメチルスルフィド(DMSO)を添加し溶解度を向上させた。実施例1で説明した2光子プロセスを用いてピラミッド型のアクリレートポリマー(図10)を形成した。

【0083】

上記反応混合物中でローズベンガルを 2×10^{-5} 9-フルオレノン-2-カルボン酸に置き換えると、実施例2で説明されているように3光子励起を用いた処理により、重合が起きた。この方法により形成された層状構造を図9に示す。この構造は、重合されたトリメチロールプロパントリメタクリレートの5つの積み重ねられた層(物体は水平から約85°回転されている)を含む。上部2層は、SEMサンプルの調製中に剥離され、内部層が現れている。

【0084】

実施例4. アクリルアミド重合

ある比率のアクリルアミド:ビスアクリルアミドを含む40%水溶液を、ローズベンガル 1×10^{-4} 、トリエタノールアミン0.1Mとした。実施例1で説明されているような2光子プロセスを用いて、ピラミッド型のポリアクリルアミドポリマー(図10)を形成した。アクリルアミドゲルは、放出を持続させるための生物活性化合物及び他の化合物のエントラップメントに対し有効である。

【0085】

実施例5. フィブリノーゲンの重合

5 mg/mL のフィブリノーゲンと 1×10^{-4} のローズベンガルを含む水溶液を、実施例 1 で説明されているような 2 光子励起を用いて重合させた。重合はまた、ローズベンガルの存在下、トリエタノールアミン無しで、2 光子励起により達成した。

【0086】

実施例 6. 製作されたマトリクス内での作用物質の短時間エンタラップメント

多光子励起により製作したマトリクス中での作用物質の短時間エンタラップメントについて、ポリアクリルアミドゲル/ロダミン 610 と BSA マトリクス/デキストランを用いて説明した。29 : 1 の比率のアクリルアミド : ビスアクリルアミドと、 1×10^{-4} M のローズベンガルと、0.1 M のトリエタノールアミンと、を含み、 2×10^{-3} M のロダミン 610 が添加された 17.5 % の水溶液の 2 光子活性化により、ポリアクリルアミドゲルを形成させた。形成されたゲルは約 $70 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$ であり、その架橋密度は、実行した連続走査の数 (50 及び 75) により照射時間を変動させることにより、異なるものとした。ロダミン 10 の放出は、長方形ゲルにわたる蛍光強度の積分により光学的にモニタした。図 22 に示した 2 つのレプリカント (replicant) 実験からのデータが示すように、架橋密度が高いとロダミン放出が遅くなる。

【0087】

BSA マトリクスを、10 mg/mL の BSA、 1×10^{-4} ローズベンガルを含み、 1×10^{-4} M のテトラメチルロダミン標識 10 キロダルトン (kD) デキストラン (モレキュラープローブ、ユージーン、OR) が添加された水溶液の 2 光子活性化により製作した。長方形 BSA マトリクスは約 $140 \mu\text{m} \times 175 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$ であり、その架橋密度は、マトリクスを形成する連続走査の数が異なっていたため (5、10 及び 20)、異なっていた。10 kD のデキストランの放出は、長方形ゲルにわたる蛍光強度の積分により光学的にモニタした。2 つのレプリカント実験からのデータを図 23 に示す。この図から、架橋密度が高いと作用物質の放出が遅くなることが示される。

【0088】

実施例 7. アルカリホスファターゼの長期エンタラップメント

酵素などの反応性作用物質の永久的なまたは長期エンタラップメントにより、可溶性反応物質がゲルまたは構成内に拡散することが可能となり、そのゲルまたは構成はその後、トラップされた作用物質の作用を受ける。この実施例では、アルカリホスファターゼのエンタラップにより、可溶性反応物質から磷酸部分が除去される。アルカリホスファターゼ活性は、モレキュラープローブ社から製造されている酵素結合蛍光 (ELF) 試薬 (B6601、ユージーン、OR) を用い、蛍光顕微鏡により、容易に分析すること及び空間的に局在化させることができるので、アルカリホスファターゼをモデル酵素として選択した。ELF 試薬から磷酸基が開裂すると、その蛍光発光波長が変化し、その蛍光強度が大きく増加し、不溶性となり、これにより、活性酵素のすぐ近くで沈殿が生じた。約 825 nm での 2 光子励起蛍光による沈殿した作用物質の励起により、像が形成された。

【0089】

したがって、アルカリホスファターゼ (シグマ P-0530) は、 1×10^{-4} のローズベンガルと、0.1 M のトリエタノールアミンと $2 \mu\text{mol}$ のウシアルカリホスファターゼとを含む 29 : 1 のアクリルアミド : ビスアクリルアミドの 40 % 水溶液の 2 光子励起により、長方形-ポリアクリルアミドゲル ($134 \mu\text{m} \times 89 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$) 内に組み込まれた。重合時間を変えると、異なる密度を有するゲルが得られた。1 つのゲルは 50 走査 (総光子線量 = 2×10^{20} 光子 / cm^2) を受け、他のゲルは 75 走査 (光子線量 = 3×10^{20} 光子 / cm^2) を受け、過飽和により 2 光子励起ゾーンの制限が減少するので、光子線量がより高いと重合された面積がわずかに大きくなった。図 24 A は、透過光によるゲルを示し、図 24 B, 24 C は、蛍光像である。下側のゲル中のアクリルアミドは、より大きな架橋密度で、光学的に製作されたものである。図 24 B は、30 分での酵素活性が、トップ付近に焦点面を有する両方のゲル内でかなり均一であることを示し、一方、図 24 C は、ガラス基板に近い焦点面での、より高い架橋密度のゲル (下側のゲル) の中央における酵素活性はより低いことが示される (60 分)。このように、高密度ゲルは、ELF 試薬が、縁からゲル内に拡散するのを阻害する。

【0090】

より小さな構成を用いてエンキャプシュレーションを達成しても良い。図25A-Cには、単一アルカリホスファターゼ添加アクリルアミドファイバが示されており、各ファイバの直径は約350nmである。図25A及び25Cは、約30分離したELF蛍光を示し、図25Bは透過光像である。時と共に行った観察により、ファイバ構成は変化することが示され、これは、ファイバは可撓性ではないこと、基板に固く付着されていないことから驚くに値しない。像はまた、酵素活性は、ファイバが基板に近接触している領域（ファイバの左手及び右手側）では減少することが示される。ELF試薬の拡散がこの領域では阻害されると仮定される。

【0091】

好ましい実施の形態について図示し説明してきたが、本発明の精神及び範囲内であれば、様々な変更及び置換が可能である。したがって、この発明について、実例として説明してきたが限定するものではないことは理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 この中で説明しているような多光子励起を用いる製作の概略図である。

【図2】 多光子励起による製作に適した広視野光学機械を有する装置の概略図である。

【図3】 多光子励起による製作に適した広視野4p i 光学機械を有する装置の概略図である。

【図4】 多光子励起による製作に適した近視野光学機械を有する装置の概略図である。

【図5】 2光子励起により製作された複数のポリウレタン棒の走査型電子顕微鏡（SEM）像である。

【図6】 この発明に従い製造されたポリウレタンシートの走査型電子顕微鏡像である。

【図7A】 ポリウレタン前駆物質の2光子励起を用いて製作したピラミッド構造の連続層板を示す低倍率（7A）、高倍率（7B）でのSEM像である。

【図7B】 ポリウレタン前駆物質の2光子励起を用いて製作したピラミッド構造の連続層板を示す低倍率（7A）、高倍率（7B）でのSEM像である。

【図8】 トリメチロールトリアクリレートの3光子活性化により製作した格子構造のSEM像である。

【図9】 多格子励起により製作した重合トリメチロールトリアクリレートシートの積み重ね層のSEM像である。

【図10】 40%ポリアクリルアミドの3層から製作したピラミッドを示す透過光顕微鏡写真である。

【図11】 重合させたウシ血清アルブミン（垂直線）とポリウレタン（水平線）を含む複合格子のSEM像である。

【図12】 BSAの水溶液から2光子励起により製作し、テキサスレッドでラベルしたBSAのいくつかのロッドを示す蛍光顕微鏡写真である。

【図13】 3光子励起を用いてBSAから作製したロッドの、低倍率（A）、高倍率（B）でのSEM像である。

【図14】 重合BSAから製作したピラミッドのSEM像である。

【図15A】 ヒト血小板のSEM像であり、（A）は、架橋フィブリノーゲンを含む線に付着しており、（B）は、BSA及びフィブリノーゲン製作溶液に暴露されたが、光学的に誘起された製作は起こっていないガラス基板の非製作領域である。

【図15B】 ヒト血小板のSEM像であり、（A）は、架橋フィブリノーゲンを含む線に付着しており、（B）は、BSA及びフィブリノーゲン製作溶液に暴露されたが、光学的に誘起された製作は起こっていないガラス基板の非製作領域である。

【図16】 バイオセンサアレイチップの概略図である。

【図17】 （A）連続繊維出力及び（B）パルス繊維出力（例えば、ビームシャッターリングによる）に対するX-Y方向におけるガルボ走査及びガルボ走査移動を使用して達成可能な広範囲のトポロジーを示す概略図である。

【図18】 ポリアクリルアミドの2光子製作により形成した約350nmの線厚を有する一連のらせんの透過光顕微鏡像である。

【図19】 増感剤及び化学架橋剤を添加しない、多光子励起による直接蛋白質架橋を示した概略図である。

【図20A】 遠隔地点での多光子励起による製作に適した装置を示した概略図である。

【図20B】 遠隔地点での多光子励起による製作に適した装置を示した概略図である。

【図20C】 遠隔地点での多光子励起による製作に適した装置を示した概略図である。

【図21】 本発明において使用される装置の概略図である。

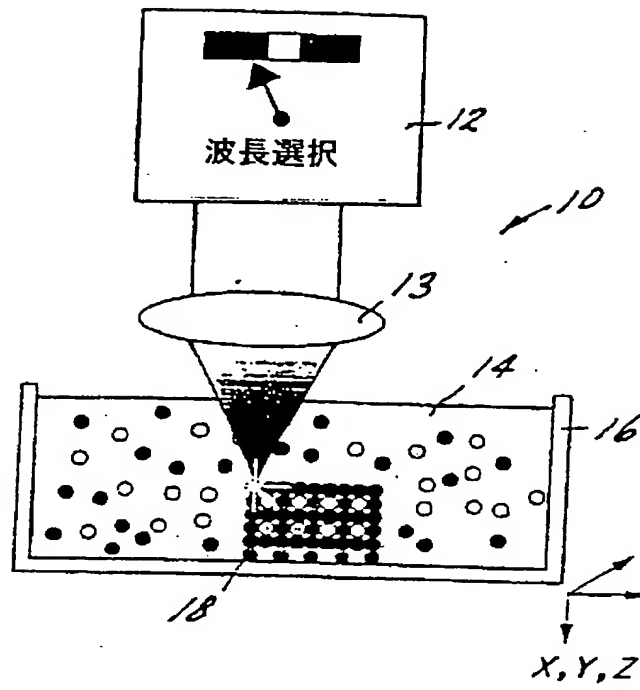
【図22】 ポリアクリルアミドゲルからのローダミンの放出を示すグラフである。

【図23】 架橋BSAマトリクスからのローダミン標識デキストランの放出を示すグラフである。

【図24】 トラップされたアルカリホスファターゼを有するゲルを示したものであり、図23Aは透過光像であり、図23B及び23Cは、酵素結合蛍光により示される酵素活性の蛍光像であり、下部ゲル中のアクリルアミドは、より大きな架橋密度で光学的に製作されたものである。

【図25】 各繊維の直径が約350nmの単一アルカリホスファターゼ付加アクリルアミド繊維を示し、図24A及び24Cは約30分離れた酵素結合蛍光を示し、図24Bは透過光像である。

【図1】



【図2】

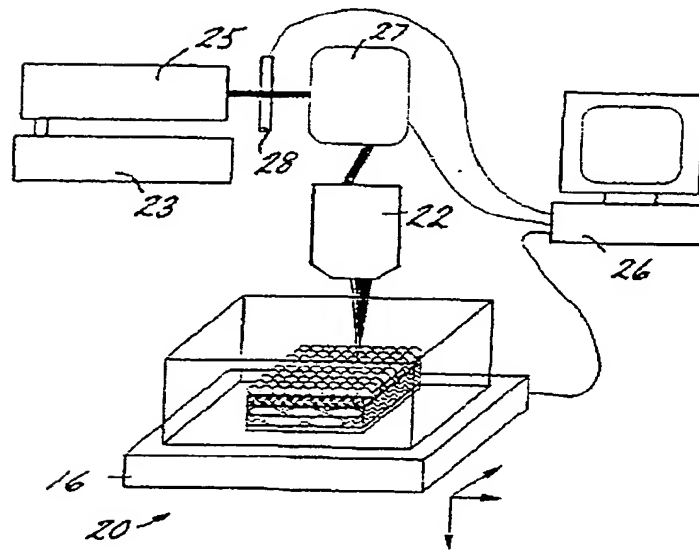


FIG. 2

【図3】

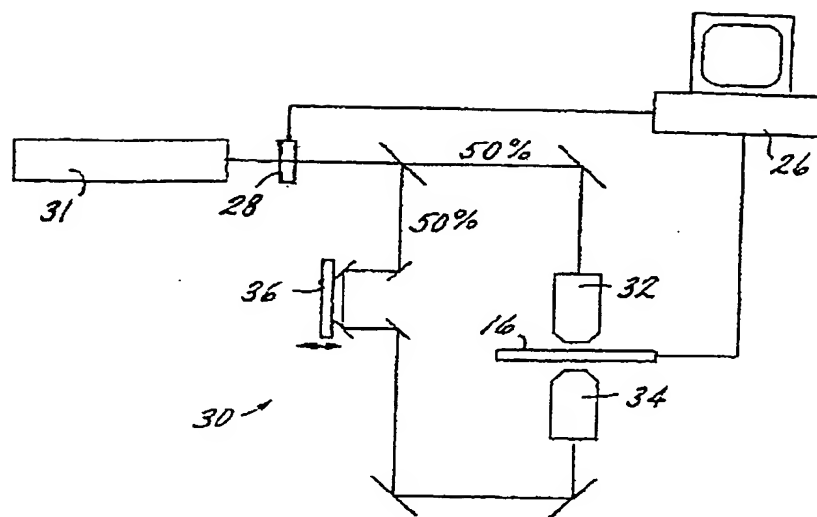


FIG. 3

【図4】

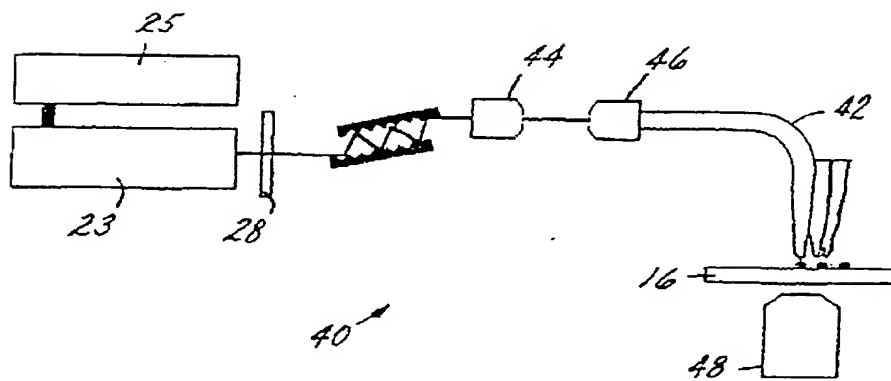


FIG. 4

【図5】

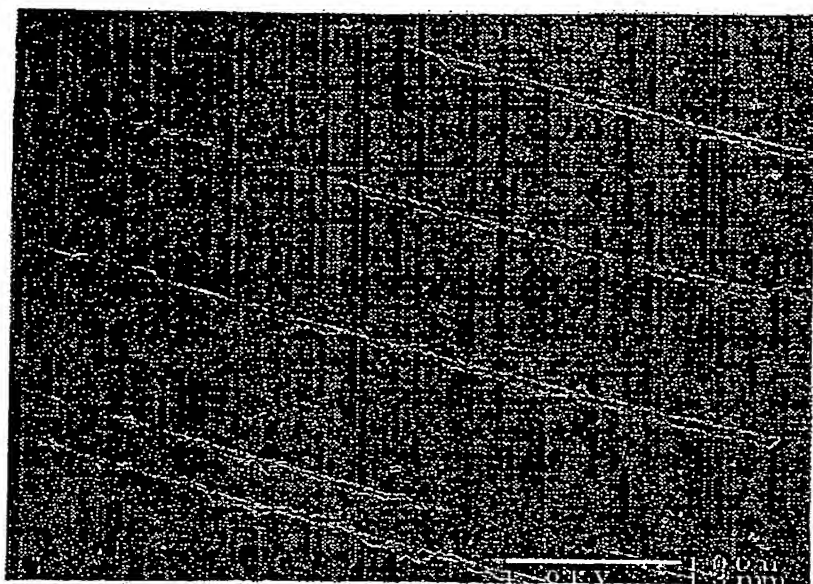


FIG. 5

【図6】

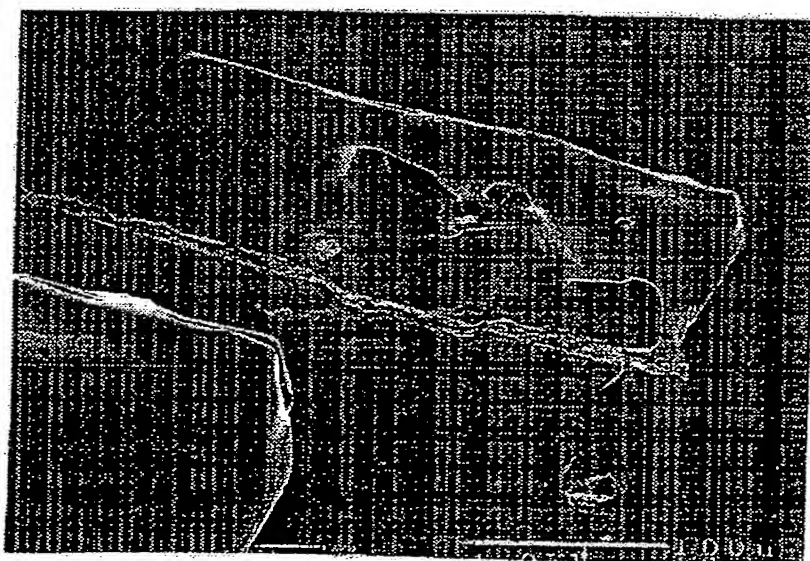


FIG. 6

【图7】

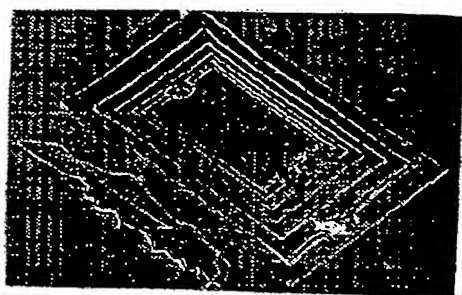


FIG. 7A



FIG. 7B

【图8】

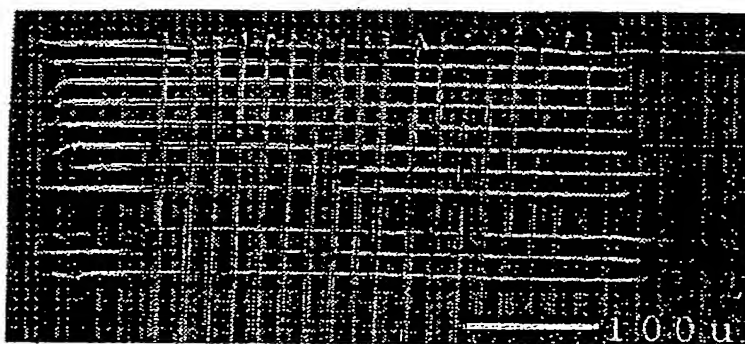


FIG. 8

【図9】

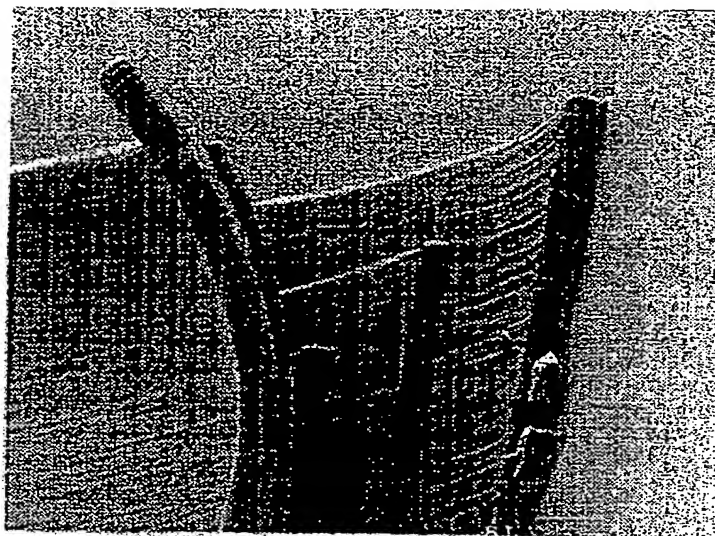


FIG. 9

【図10】



FIG. 10

【図11】

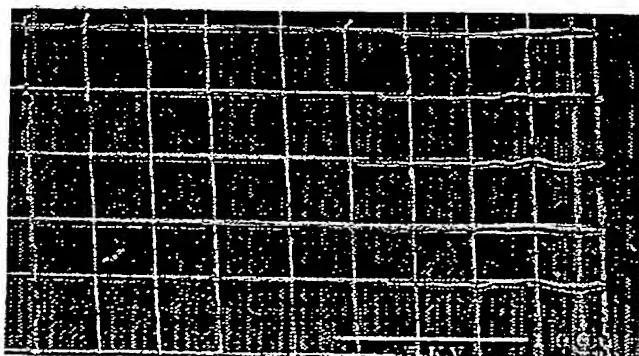


FIG. 11

【図12】

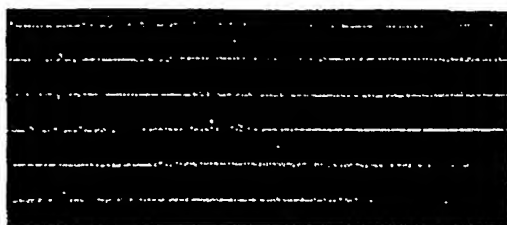


FIG. 12

【図13】

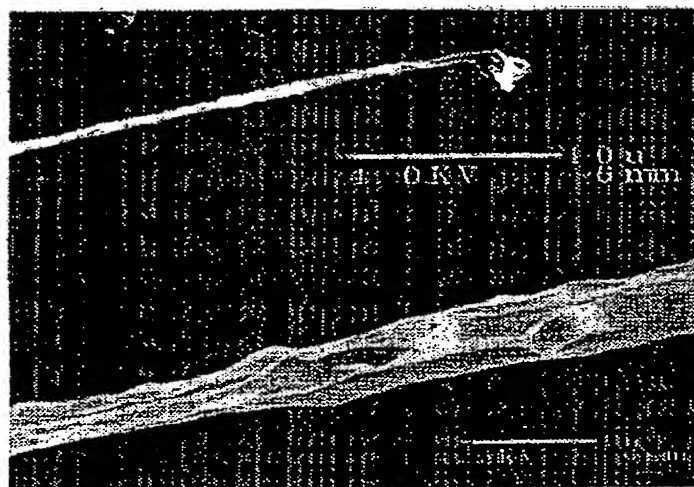


FIG. 13

【図14】

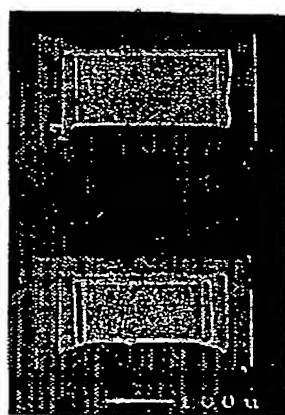


FIG. 14

【図15】

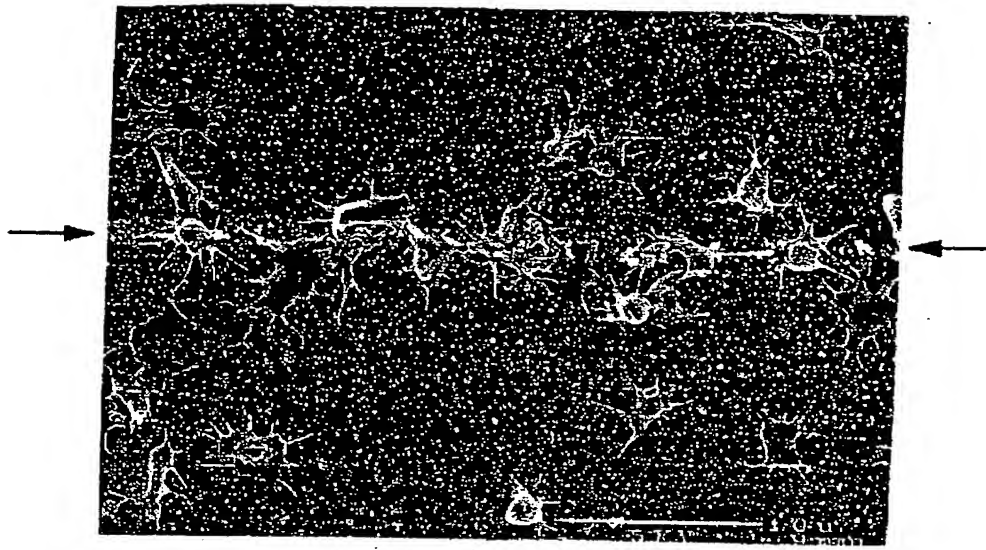


FIG. 15A

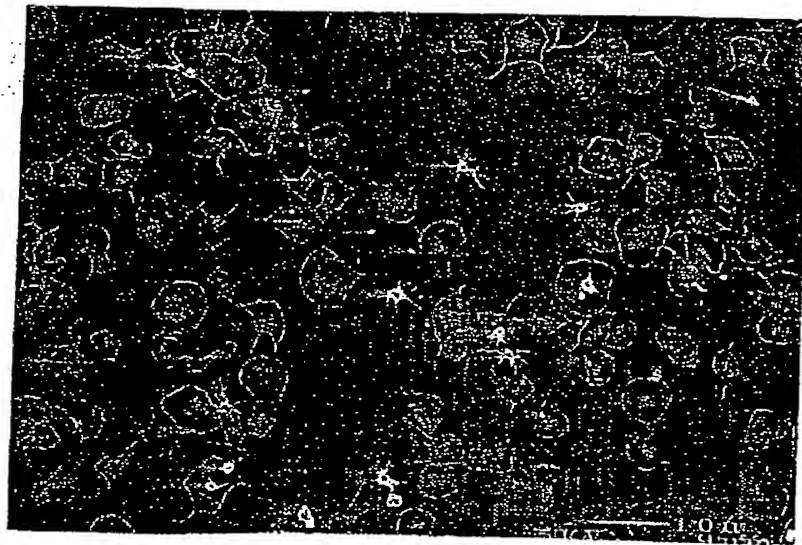
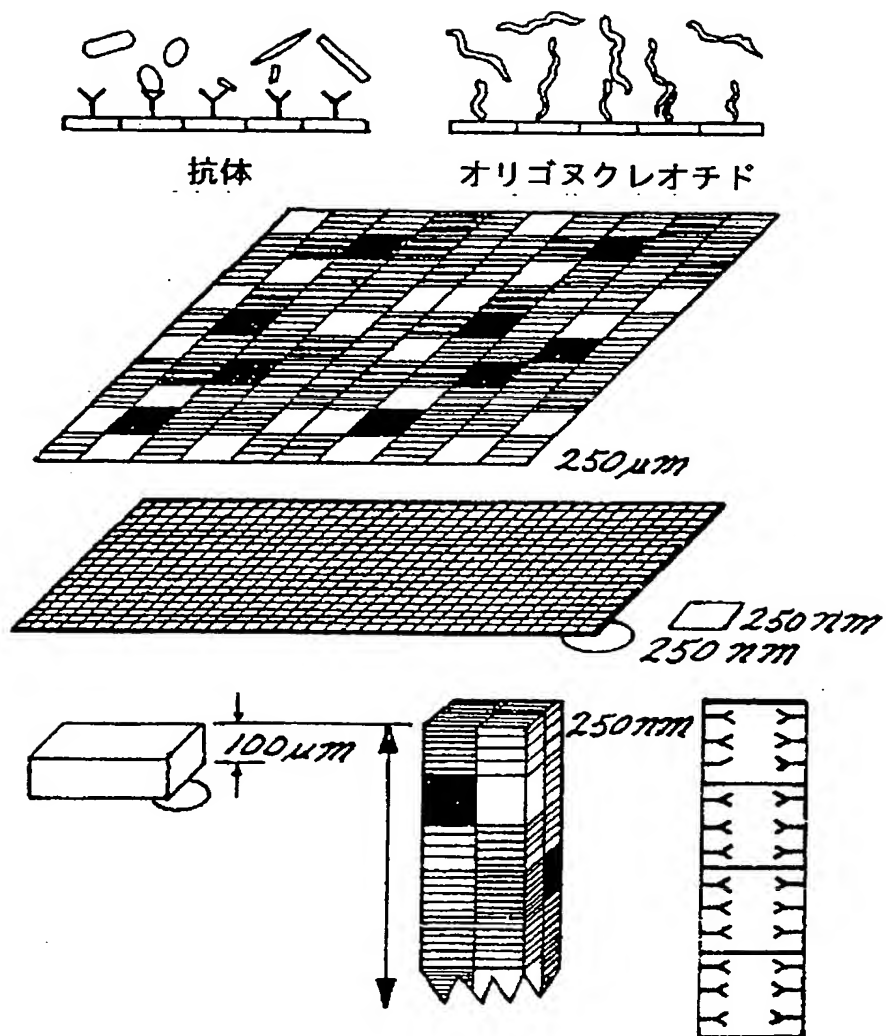
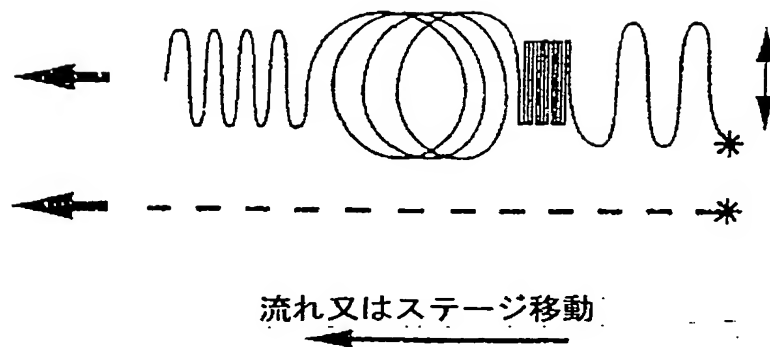


FIG. 15B

【図16】



【図17】



【図18】

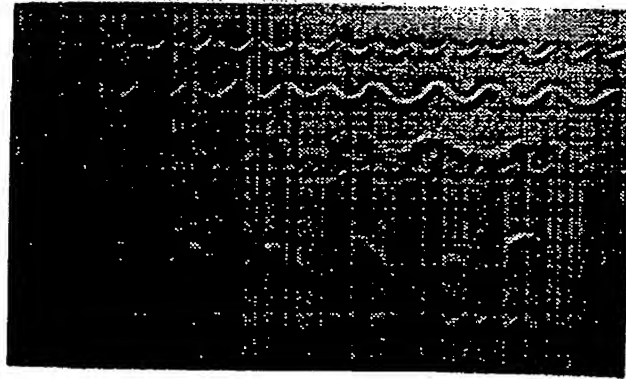
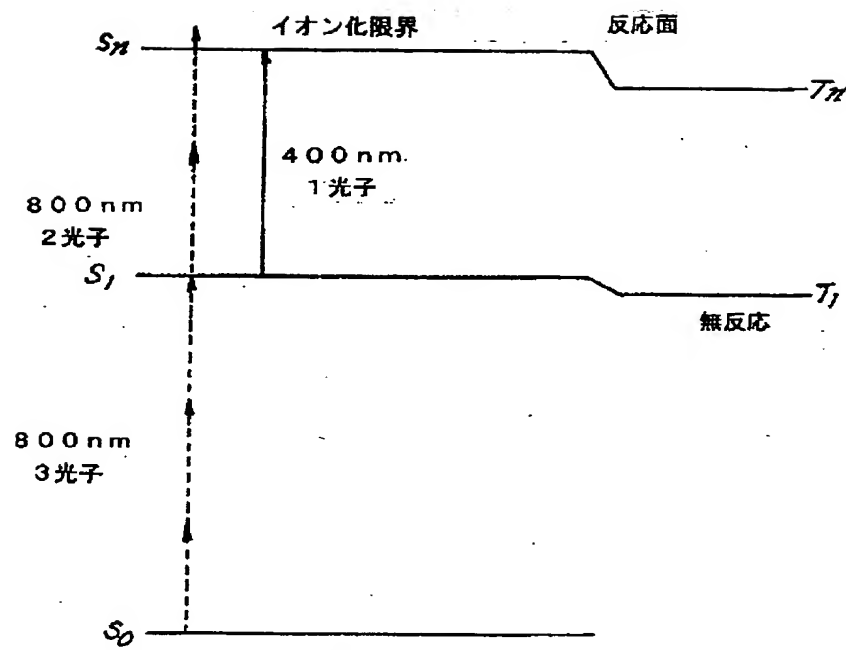


FIG. 18

【図19】



【図20】

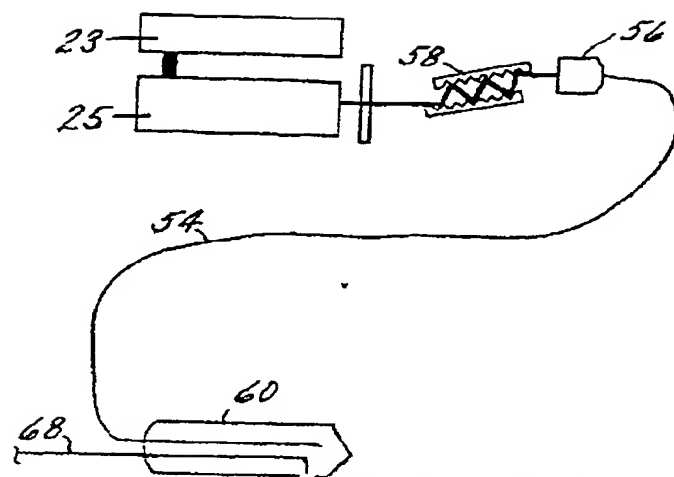


FIG. 20A

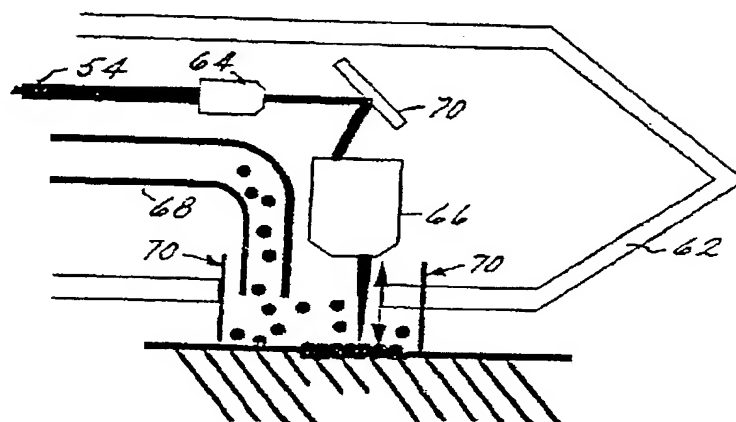


FIG. 20B

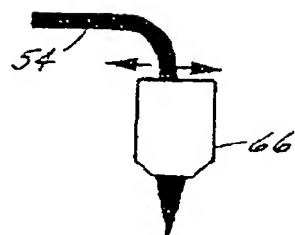


FIG. 20C

【図21】

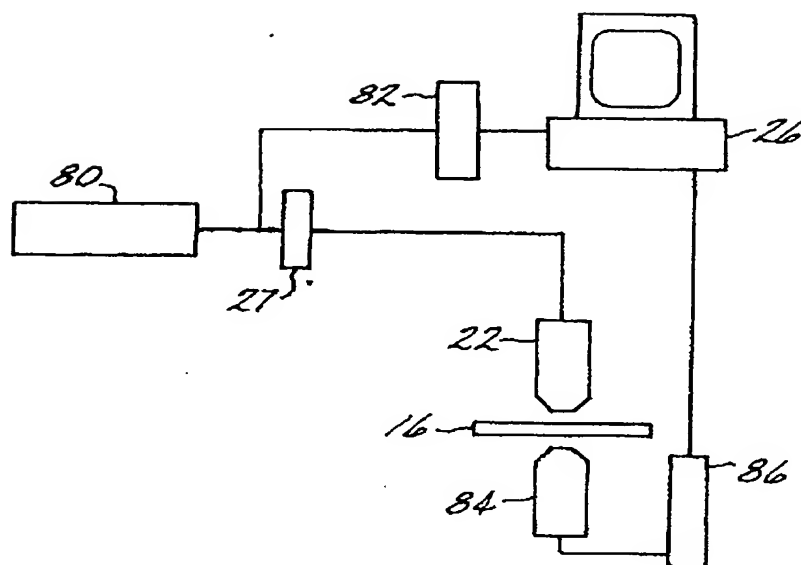
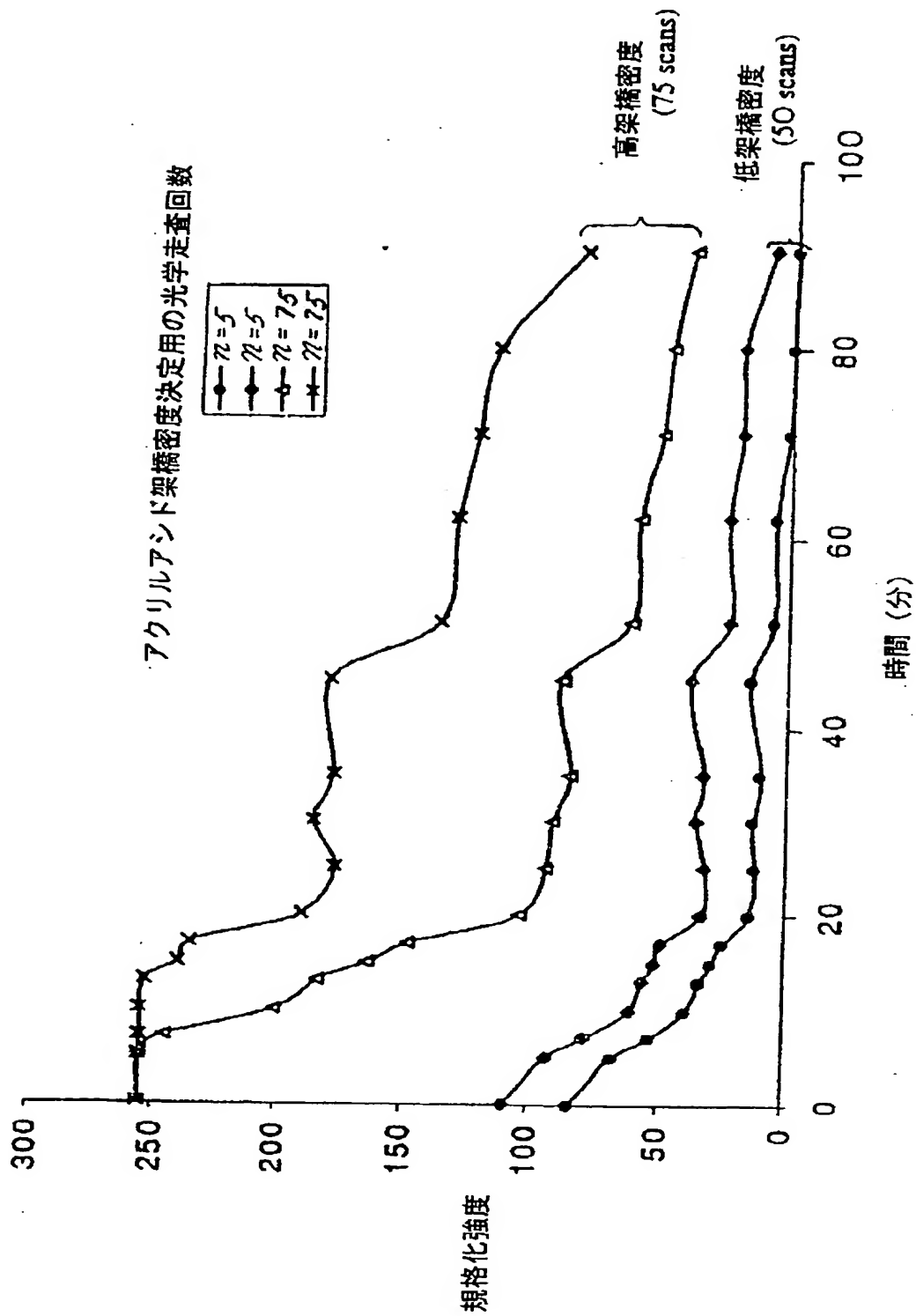
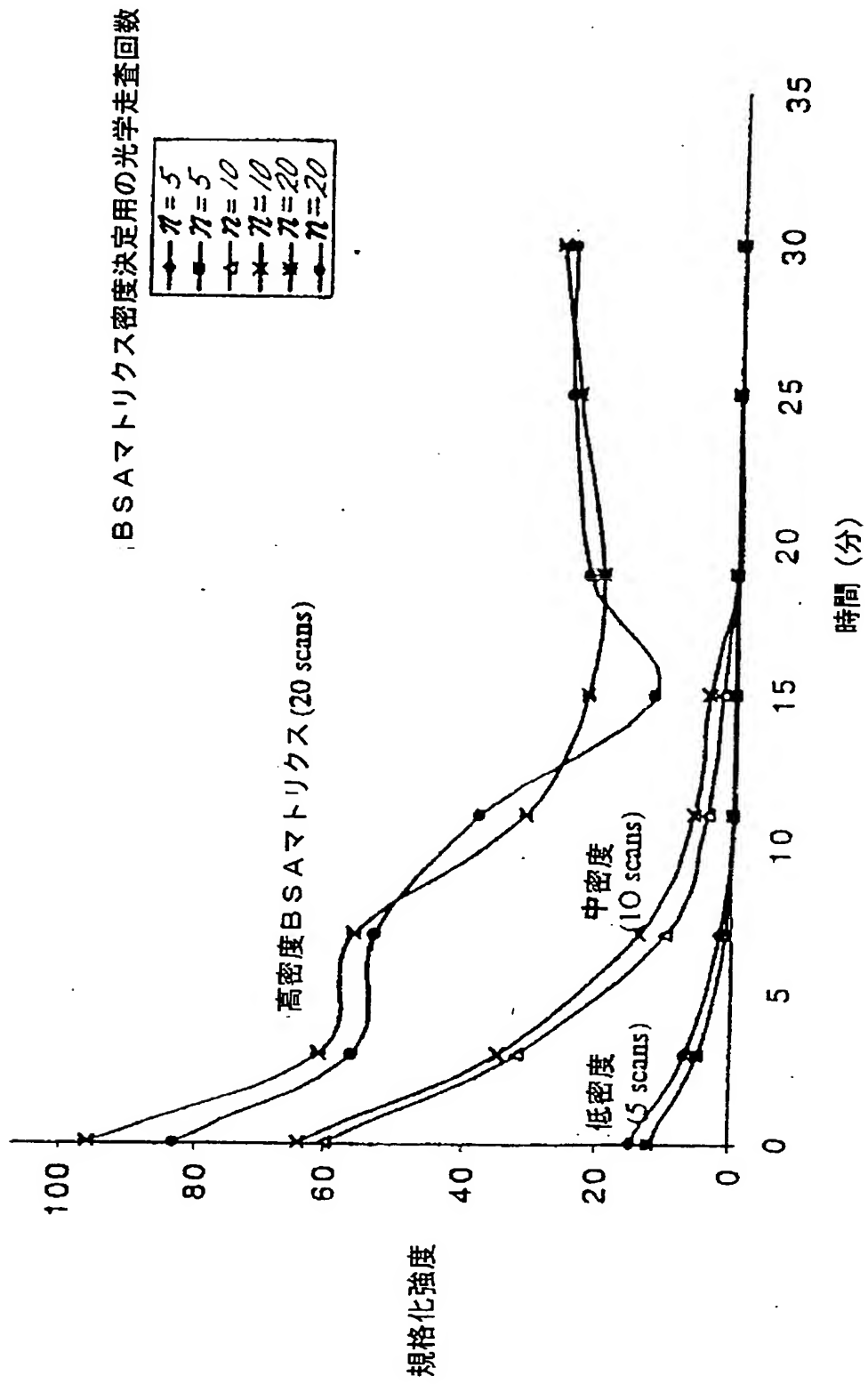


FIG. 21

【図22】



【図23】



【図24】

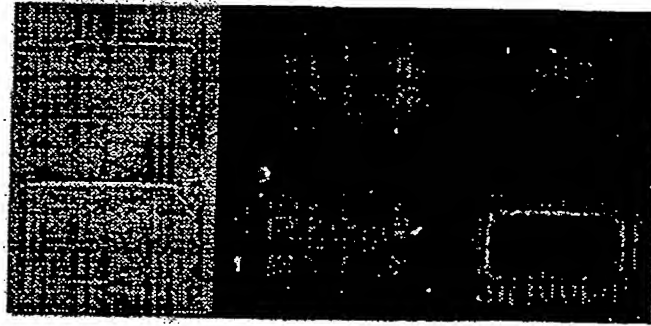


FIG. 24

【図25】

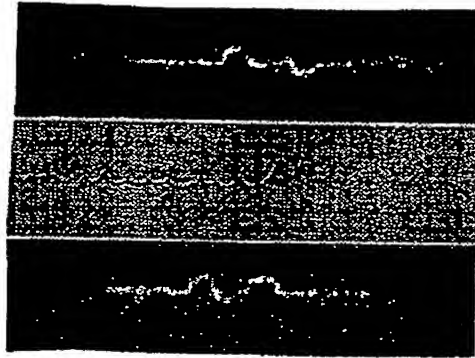


FIG. 25

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/08805

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : G03C 5/00; G03F 7/00, 7/20 US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 430/270.1, 281.1, 311, 320; 250/492.1, 493.1; 219/121.73, 121.75, 121.77 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,289,407 A (STRICKLER et al) 22 February 1994, abstract and column 3, line 50 to column 4, line 54.	1-59
A, P	US 5,808,256 A (KIRA et al) 15 September 1998, abstract and column 2, line 36 to column 3, line 26.	1-59
A	US 5,360,764 A (CELOTTA et al) 01 November 1994, abstract and column 1, line 46 to column 2, line 12.	1-59
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 JUNE 1999		Date of mailing of the international search report 15 JUL 1999
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JOHN MCPHERSON Telephone No. (703) 308-0661

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/08805

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

430/270.1, 281.1, 311, 320; 250/492.1, 493.1; 219/121.73, 121.75, 121.77

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS

search terms: multi photon, multiphoton, two photon, three photon, four photon, nanometer, nm, nanofabrication

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP